

Dajana Šulavjak

Stavovi i mišljenja liječnika o terapiji bakterijskih infekcija bakteriofagima

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Klinička farmacija s farmakoterapijom, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Centru za primijenjenu farmaciju pod stručnim vodstvom doc.dr.sc. Maje Ortner Hadžiabdić i suvoditeljstvom prof.dr.sc. Maje Šegvić Klarić.

Zahvaljujem mentoricama doc.dr.sc. Maji Ortner Hadžiabdić i prof.dr.sc. Maji Šegvić Klarić na prilici da zajedno istražimo ovu zanimljivu temu, na uloženom trudu i ugodnoj suradnji. Puno hvala Kruni, mojoj obitelji i prijateljima što su uvijek bili tu za mene; puni podrške, ljubavi i lijepih riječi.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Antimikrobni lijekovi i antibiotici	1
1.2. Rezistencija bakterija na antibiotike	1
1.3. Alternative antibioticima	3
1.4. Bakteriofagi	5
1.4.1. Povijest i istraživanja	6
1.4.2. Prednosti i nedostaci	8
2. OBRAZLOŽENJE TEME	10
3. MATERIJALI I METODE	11
3.1. Ispitanici	11
3.2. Instrument za prikupljanje podataka	11
3.3. Protokol	12
3.4. Izrada upitnika	13
3.5. Obrada podataka	13
3.5.1. Validacija upitnika.....	14
3.5.2. Statistička analiza podataka.....	14
4. REZULTATI	16
4.1. Opće karakteristike ispitanika	16
4.2. Validacija.....	18
4.3. Stavovi liječnika o problemu rezistencije na antibiotike	18
4.4. Upućenost i stavovi liječnika o alternativama antibioticima	21
4.5. Stavovi i mišljenja liječnika o terapiji bakteriofagima	22
4.6. Povezanost karakteristika ispitanika sa stavovima o bakterijskoj rezistenciji i alternativama antibioticima.....	30
4.7. Povezanost specijalizacije liječnika i poznavanja alternativa antibioticima	30
5. RASPRAVA.....	32
5.1. Rezistencija bakterija na antibiotike	32
5.2. Alternative antibioticima	34
5.3. Terapija bakteriofagima	34
6. ZAKLJUČAK.....	37
7. LITERATURA.....	38
8. SAŽETAK/SUMMARY.....	44

9. PRILOZI.....	46
9.1. Upitnik.....	46
9.2. Molba za suradnju u provedbi istraživanja u svrhu izrade diplomskog rada.....	53
10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

Popis tablica:

Tablica 4.1. Demografski podaci.

Tablica 4.2. Stav liječnika o rezistenciji bakterija na antibiotike.

Tablica 4.3. Upoznatost liječnika s alternativama antibioticima.

Tablica 4.4. Prikaz broja i postotka ispitanika koji su smatrali obećavajućim/u potpunosti obećavajućim pojedinu alternativu antibioticima.

Tablica 4.5. Prikaz stavova liječnika o terapiji bakteriofagima.

Tablica 4.6. Prikaz broja i postotka liječnika koji bi preporučili terapiju bakteriofagima.

Tablica 4.7. Prikaz mišljenja ispitanika o glavnim prednostima bakteriofaga.

Tablica 4.8. Prikaz mišljenja ispitanika o glavnim nedostacima bakteriofaga.

Tablica 4.9. Prikaz glavnih načina informiranja ispitanika o terapiji bakteriofagima.

Tablica 4.10. Prikaz ukupnog rezultata stavova liječnika o terapiji bakteriofagima.

Popis slika:

Slika 1.1. Stope MRSA-e u Hrvatskoj (Odbor za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike, Akademija medicinskih znanosti Hrvatske).

Slika 4.1. Prikaz stavova liječnika o bakterijskoj rezistenciji kao svjetskom problemu.

Slika 4.2. Prikaz stavova liječnika o bakterijskoj rezistenciji u Hrvatskoj.

Slika 4.3. Prikaz stavova liječnika o bakterijskoj rezistenciji na radnom mjestu.

Slika 4.4. Prikaz stavova liječnika o bakterijskoj rezistenciji u budućnosti.

Slika 4.5. Prikaz stavova liječnika o budućnosti liječenja bakterijskih infekcija.

Slika 4.6. Prikaz želja liječnika o informiranju u vezi terapije bakteriofagima.

Slika 4.7. Prikaz mišljenja liječnika o razmatranju terapije bakteriofagima bez randomiziranih kliničkih studija.

Slika 4.8. Prikaz mišljenja liječnika o pravu informiranja pacijenata o terapiji bakteriofagima.

Slika 4.9. Prikaz mišljenja liječnika o potrebi zastupljenosti znanstvenih spoznaja o terapiji bakteriofagima u obrazovanju.

Slika 4.10. Prikaz mišljenja liječnika o vlastitom znanju o terapiji bakteriofagima.

Slika 4.11. Prikaz povezanosti specijalizacije i mišljenja liječnika o problemu bakterijske rezistencije na radnom mjestu.

1.UVOD

1.1. Antimikrobni lijekovi i antibiotici

Antimikrobni lijekovi su prirodne (produkti mikroba), polusintetske ili sintetske supstancije koje uništavaju ili sprječavaju rast uzročnika iz svog spektra djelovanja te ih dijelimo na antibakterijske, antivirusne, antifungalne i antiparazitske lijekove (Francetić, 2001).

Antibiotici su produkti sekundarnog metabolizma mikroorganizama za koje se pretpostavlja da djeluju kao obrambeni mehanizam protiv bakterija, odnosno tehnika samoočuvanja (Awad i sur., 2012).

Sredinom dvadesetog stoljeća, otkrićem antibiotika i boljim razumijevanjem bolesti, započela je nova era medicine. Poboljšala se kvaliteta života i očekivani životni vijek te su antibiotici postali neophodni i sveprisutni (Lin i sur., 2017).

Međutim, godinama kasnije, antibiotici su pokazali i svoje nedostatke. Neracionalna upotreba u humanoj medicini, u uzgoju životinja i biljaka te dospijevanje antibiotika u okoliš, doprinijelo je razvoju rezistencije te bolesti koje su bile izlječive postaju ponovo neizlječive (Poter, 2013).

1.2. Rezistencija bakterija na antibiotike

„Otpornost (rezistencija) bakterija na antibiotike znači da antibiotici u koncentracijama koje se mogu postići u ljudskom organizmu ne djeluju na bakterije.“ (Kalenić i sur.,2013)

Praćenje rezistencije bakterija na antibiotike u Hrvatskoj započelo je 1996. godine kada je osnovan Odbor za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike na Akademiji medicinskih znanosti Hrvatske. Vlada Republike Hrvatske izlaže Nacionalni program za kontrolu otpornosti bakterija na antibiotike svakih pet godina, a izrađuju ga stručnjaci, članovi ISKRA-e, Interdisciplinarne sekcije za kontrolu rezistencije na antibiotike (Tambić-Andrašević, 2009).

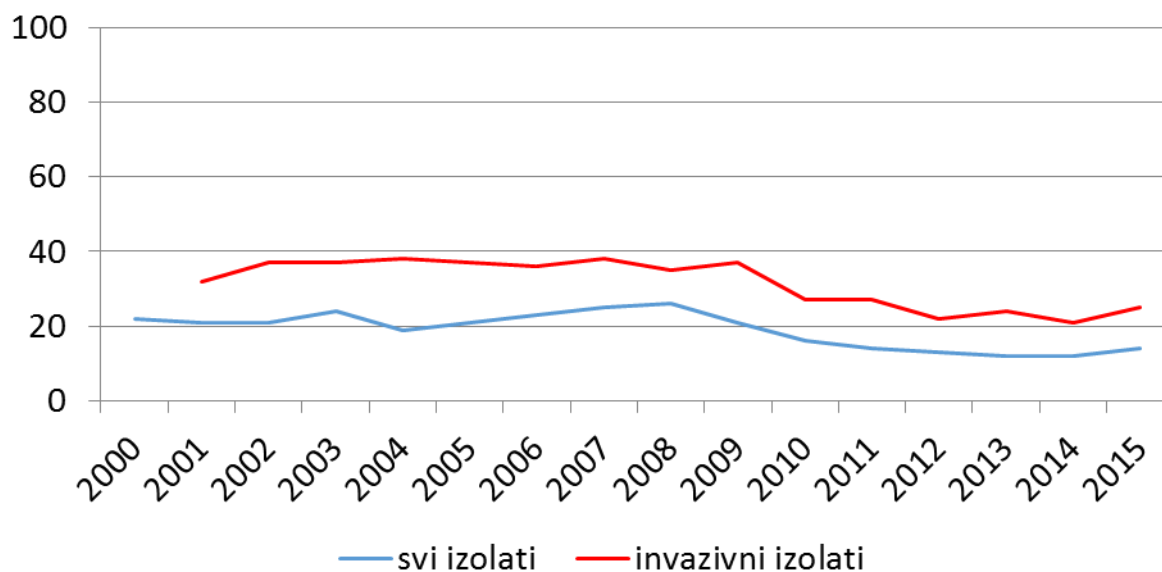
Najnoviji nacrt Nacionalnog programa za kontrolu otpornosti bakterija na antibiotike 2017.-2021. planira aktivnosti u skladu s rezolucijom Svjetske zdravstvene organizacije (2001),

rezolucijom Vijeća Europske unije (1999), globalnim akcijskim planom Svjetske zdravstvene organizacije (2015) i planom Europskog centra za prevenciju i kontrolu bolesti (2014 – 2020), a sukladan je i ciljevima iz Programa održivog razvoja do 2030. godine Ujedinjenih naroda. Ovaj program daje jasne smjernice koje uključuju praćenje rezistencije bakterija na antibiotike i potrošnje antimikrobnih lijekova; podizanje svijesti liječnika, farmaceuta i pacijenata o štetnosti prekomjerne uporabe antibiotika; sprječavanje pojave i kontrolu širenja infekcija; optimalnu upotrebu antimikrobnih lijekova; dobru međunarodnu suradnju s institucijama koje se bave istom problematikom (ECDC, WHO, OIE ...) te podupiranje znanstvenih istraživanja na području rezistencije bakterija (www.zdravlje.gov.hr).

Hrvatska se ubraja u europske zemlje s visokom potrošnjom antibiotika i visokom stopom rezistencije na mnoge antibiotike (Tambić-Andrašević, 2009).

Problem infekcija s rezistentnim bakterijama najočitiji je u bolnicama. Iz tog su razloga bolničke ustanove uvele koncept „rezervnih lijekova“ (vakomicin, ceftriakson, ceftazidim, cefoperazon, cefepim, amikacin, meropenem, imipenem sa cilastinom, ertapenem, piperacilin s tazobaktamom, teikoplanin, linezolid, ampicilin sa sulbaktamom) kako bi se produljila njihova učinkovitost ili tzv. „klinički život“ (Francetić i sur., 2015.).

U Republici Hrvatskoj najveći problem predstavlja *Acinetobacter baumannii* otporan na karbapeneme, tzv. CRAB te enterobakterije otporne na karbapeneme, pogotovo *Klebsiella pneumoniae* koja proizvodi karbapenemaze (KPC enzim). Uz njih treba spomenuti meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) čiji se udio među izolatima *S.aureus* smanjuje u Europi (Slika 1.1.) (www.zdravlje.gov.hr).



Slika 1.1. Stope MRSA u Hrvatskoj. Odbor za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike, Akademija medicinskih znanosti Hrvatske. (www.zdravlje.gov.hr)

Ozbiljnost problematike rezistencije bakterija na antibiotike potaknula je sve veći interes i razmatranje ne-antibiotskih mogućnosti u prevenciji i liječenju bakterijskih infekcija (Wittebole i sur., 2014).

1.3. Alternative antibioticima

Alternative antibioticima su produkti različitog porijekla, koji nisu antibiotici, čija meta može biti bakterija ili domaćin, a koriste se za liječenje i prevenciju bakterijskih infekcija, umjesto ili uz antibiotike (Czaplewski i sur., 2016).

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) i World Health Organization (WHO) proglasili su rezistenciju bakterija na antibiotike prijetnjom za globalno zdravlje i sve češće upozoravaju na povratak „pred-antibiotskog razdoblja“ pa je potrebno razmotriti koje su to alternative antibioticima (Lin i sur., 2017).

U alternative antibioticima koje obećavaju spadaju protutijela, probiotici, bakteriofagi (1.4.), lizini bakteriofaga, antimikrobni peptidi, imunostimulirajući produkti i cjepiva.

Protutijela se mogu koristiti u prevenciji gram pozitivnih i gram negativnih infekcija te moguće kao dodatna terapija. Oni vežu i inaktiviraju patogene, njihove faktore virulencije ili toksine (*Clostridium difficile*, toksin A i B; *Staphylococcus aureus*, α -toksin; *Pseudomonas aeruginosa*, sekretorni sustav). Smatraju se sigurnim za upotrebu te tehnološki izvedivim (Czaplewski i sur., 2016).

Probiotici su živi mikrobi koji, ukoliko se uzmu u dovoljnim dozama, mogu imati pozitivan učinak na zdravlje kroz modulaciju lokalnog imunog odgovora, modifikaciju crijevne flore, kompeticiju za adherenciju na epitel, oslobađanje antimikrobnih faktora, prevenciju translokacije bakterija i održavanje integriteta intestinalne barijere (Theodorakopoulou i sur., 2013). Smatraju se učinkovitima u prevenciji i terapiji dijareje uzrokovane *Clostridium difficile* ili antibioticima (Goldenberg i sur., 2013). Istražuju se kombinacije probiotika s antibioticima ili bakteriofagima za upotrebu i u drugim indikacijama (Czaplewski i sur., 2016).

Lizini bakteriofaga su enzimi (hidrolaze peptidoglikana) bakteriofaga koji razgrađuju staničnu stjenku bakterija. Istražuju se kao dopuna antibioticima. Primjerice, lizin CF-301 ima jaki litički učinak na *Staphylococcus aureus*, uključujući i MRSA-u, inhibirajući učinak na biofilm i sinergistički učinak s antibioticima. Kombinacije CF-301 s vankomicinom ili daptomicinom pokazale su veću stopu preživljavanja od korištenja isključivo antibiotika (Schuch i sur., 2014). Razmatraju se i kao samostalna terapija zbog izravnog i brzog (≥ 3 log CFU u 30 minuta) antibakterijskog učinka s minimalnim ili nikakvim posljedicama na komenzalnu floru (Pastagia i sur., 2013). Prvi komercijalno dostupni endolizin je Staphfect, Micros, za kožne infekcije uzrokovane bakterijom *Staphylococcus aureus* (Salmond i Fineran, 2015).

Antimikrobni peptidi su molekule koje višestanični organizmi stvaraju kao prvu liniju obrane od patogena, a kod viših eukariota imaju i imunomodulatornu ulogu (Ling-Juan i Richard, 2016.). Prednosti antimikrobnih peptida su široki spektar aktivnosti, niska imunogenost, brzi učinak i slabi razvoj rezistencije. Potrebna su opsežna istraživanja i rješenja (toksičnost, cijena, osjetljivost na enzime) koja bi omogućila njihovu sistemsku primjenu (Czaplewski i sur., 2016).

Imunostimulirajući produkti se istražuju s ciljem poboljšanja ili pokretanja antimikrobne zaštite domaćina vlastitim imunitetom uz ograničavanje ozljede tkiva kao posljedice upalnih procesa (Hancock i sur., 2012). Istražuju se za prevenciju ili terapiju (s antibioticima) infekcija uzrokovanih gram pozitivnim i gram negativnim bakterijama, a uključuju fenilbutirat, vitamin D i bakterijske ekstrakte za oralnu primjenu kod respiratornih infekcija (Czaplewski i sur., 2016). Potiču stvaranje urođenih antimikrobnih peptida (Steinmann i sur., 2009; Wang i sur., 2004). Mehanizam bakterijskih ekstrakata nije potpuno jasan, ali se smatra da uključuju Toll-like receptore (Duggan i sur., 2011).

Cjepiva, istražuju se nova cjepiva za prevenciju infekcija bakterijama, među koje spada *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* (Czaplewski i sur., 2016).

1.4. Bakteriofagi

Bakteriofagi su virusi koji inficiraju bakterije vezanjem na specifične receptore zbog čega su većinom specifični za jednu bakterijsku vrstu ili nekoliko tipova te su bezopasni za eukariote (www.phagoburn.eu). Nalaze se svugdje gdje se mogu naći i bakterije. Utvrđeno je da u vodi ima 10^4 do 10^8 bakteriofaga po mililitru, 10^9 po gramu u tlu, odnosno 10^{32} bakteriofaga na cijelom planetu (Hanlon, 2007; Weinbauer, 2004).

Sastoje se od DNA ili RNA i kapside te posjeduju izdanke za prihvaćanje na receptore bakterija. Mogu imati litički ili lizogeni životni ciklus (Kalenić i sur., 2013).

Bakteriofagi koji se istražuju za primjenu u liječenju bakterijskih infekcija spadaju u red Caudovirales i uključuju porodice *Myoviridae*, *Siphoviridae* i *Podoviridae* (Wittebole i sur., 2014).

Moguće primjene bakteriofaga su terapija bakterijskih infekcija (terapija bakteriofagima, endolizini, depolimeraze EPS-a i LPS-a s degradirajućim učinkom na biofilm, senzitivizacija rezistentnih bakterija unošenjem gena, konjugacija s antibioticima), otkrivanje bakterija u uzorku (litički plakovi, ispitivanje amplifikacije faga, genetički modificirani fagi-reporteri...), suzbijanje biljnih patogena i patogena u hrani (*Listeria monocytogenes* i LISTEX P100/ListShield), nosači proteina (cjepiva, genska terapija..) te vektori u biotehnologiji

(Roach i Donovan, 2015; Salmond i Fineran, 2015; Bakhshinejad i sur., 2014; Schmelcher i Loessner, 2014; Pande i sur., 2010; [www. biocyclopedia.com](http://www.biocyclopedia.com)).

Također, otkriveno je da bakteriofagi čine 90 posto crijevnog viroma (Reyes i sur., 2012). U budućnosti to bi moglo značiti uporabu bakteriofaga u modulaciji crijevne mikrobiote; održavanju povoljnog bakterijskog sastava crijeva, imunomodulaciji i regulaciji metabolizma (Scarpellini i sur., 2015).

Bakteriofagi se najčešće proizvode u bioreaktoru u bakterijskim kulturama. Tijekom faze log rasta dodaju se bakteriofagi koji inficiraju bakterije te se, nakon kratkog lag perioda, oslobađaju virioni. Nastali lizat, osim bakteriofaga, sadrži ostatke fermentacijskog medija i bakterija što je potrebno ukloniti centrifugiranjem i/ili filtracijom. Moguće je provesti dodatno pročišćavanje od proteina i DNA bakterija ili endotoksina (na primjer ionskom izmjenom ili gel filtracijom). Nakon toga fag se suspendira u fiziološkoj otopini ili puferu te pohrani u hladnjak, a radi očuvanja stabilnosti i vijabilnosti poželjna je daljna obrada te se istražuje enkapsulacija bakteriofaga pomoću liofilizacije, sušenja raspršivanjem, liposoma i drugog (Malik i sur., 2017).

1.4.1. Povijest i istraživanja

Bakteriofage je prvi opisao Frederick Twort 1915. godine kao transparentni materijal kojeg luče mikroorganizmi te koji ne može rasti bez prisutnosti bakterija. Dvije godine kasnije, Félix d'Herelle, kojeg mnogi smatraju utemeljiteljem terapije bakteriofagima, je izolirao „anti-Shiga mikrob“ iz uzorka stolice pacijenta koji se oporavljao od shigeloze te otkrio da uzrokuje lizu tog bacila. D'Herelle je nastavio istraživanja u tom području i uveo upotrebu bakteriofaga u kliničku medicinu. Međutim, tadašnji nedostatak znanja o DNA i RNA sprječavao je potpuno razumijevanje biologije bakteriofaga, a provedene studije nisu imale valjane kontrole i konzistentne rezultate te je ideja primjene bakteriofaga u medicinske svrhe bila iznimno kontroverzna od samog početka, a otkrićem antibiotika i napuštena, osim u zemljama nekadašnjeg SSSR-a, Poljske i, u manjoj mjeri, u Indiji (Salmond i Fineran, 2015; Wittebole i sur., 2014).

U početku, antibiotici su bili dostupni, jeftini i veoma učinkoviti protiv gotovo svih bakterijskih infekcija, no, s vremenom, zbog problema rezistencije opet se pojavio veliki interes za alternative antibioticima, a pogotovo bakteriofage (Keen, 2012).

Nedostatak dobro dizajniranih kliničkih ispitivanja učinkovitosti i sigurnosti terapije bakteriofagima u Europi te odluka Europske medicinske agencije da terapija bakteriofagima treba proći autorizacijske procedure, kao i svaki drugi lijek, potakla je projekt Phagoburn, „prvo prospektivno, multicentrično, randomizirano, jednostruko slijepo i kontrolirano kliničko ispitivanje terapije bakteriofagima po standardima GMP-a i GCP-a.“ Projekt je trajao od srpnja 2013. do veljače 2017. godine u Francuskoj, Belgiji i Švicarskoj te se još očekuje detaljni izvještaj. Evaluirali su tretman opekline inficiranih bakterijama *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* (www.phagoburn.eu).

Pet godina prije, provelo se prvo formalno istraživanje sigurnosti bakteriofaga u SAD-u. Istraživala se sigurnost koktela od osam bakteriofaga za tretiranje venskog ulkusa inficiranog bakterijama *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* te se pokazao sigurnim, no još je potrebno potvrditi sigurnost u fazi 2 (Rhoads i sur., 2009).

Istražuje se i uloga bakteriofaga u dijagnostici. Primjerice, tim s Albert Einstein College of Medicine i N.R. Mandela (School of Medicine in Durban, South Africa) je napravio fluorofag sa zelenim fluorescentnim proteinom koji omogućuje direktnu vizualizaciju bakterije *Mycobacterium tuberculosis* u uzorku sputuma dok dosadašnji testovi traju i do dva mjeseca (Jain P i sur., 2012).

Trenutno ne postoje odobreni preparati s bakteriofagima za ljudsku uporabu u Europskoj uniji i SAD-u, no postoje preparati za biokontrolu bakterija u prehrambenoj industriji protiv *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella* spp., *Pseudomonas syringae*, *E. coli* O157:H7, MRSA, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp. i drugi (Lin i sur., 2017).

Među inovacije je bitno spomenuti CRISPR/Cas sustav (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) koji donosi nove mogućnosti u bioinženjerstvu faga. Takvi bakteriofagi bi mogli uništiti plazmid s genima za rezistenciju na antibiotike te bi se mogli koristiti na bolničkim površinama za smanjenje širenja rezistencije (Yosef i sur., 2015).

1.4.2. Prednosti i nedostaci

Specifičnost bakteriofaga za, najčešće, jednu vrstu bakterije je prednost u odnosu na antibiotike zbog očuvanja normalne ljudske mikrobiote te ukoliko bi patogen infekcije koje želimo tretirati bio jedini i poznat. Međutim, često se ne radi o takvoj situaciji i tada bi specifičnost karakterizirali kao nedostatak, no i tada postoje tzv. kokteli bakteriofaga (Lin i sur., 2017).

Bakteriofagi se smatraju netoksičnim i nisu zabilježeni ozbiljni neželjeni učinci kao kod antibiotika (Loc-Carrillo i Abedon, 2011). Moguće komplikacije uključuju imunološke reakcije (zbog kojih neki istraživači smatraju da bakteriofage ne bi smjeli koristiti imukompromitirane osobe) te tzv. „leaky gut“, disfunkciju intestinalne barijere (Lin i sur., 2017). Također, postoji mogućnost da neki bakteriofagi modificiraju bakteriju tako da joj povećaju patogenost te bi se iz tog razloga trebalo izbjegavati lizogene fage (Abedon i sur., 2011).

Antibiotici se ne koncentriraju na mjestu infekcije dok se bakteriofagi repliciraju na mjestu infekcije, što omogućuje manje doze te nemogućnost opstanka bakteriofaga ukoliko nema bakterija (Loc-Carrillo i Abedon, 2011).

Bakterije su razvile brojne mehanizme rezistencije na bakteriofage, međutim, bakteriofagi su razvili različite protumjere tim mehanizmima. Bakterije mogu prevenirati adheziju bakteriofaga na površinske receptore, a bakteriofagi mogu prilagoditi proteine koji se vežu na receptore. Bakterije mogu ukloniti virusnu DNA restrikcijskim endonukleazama, dok bakteriofagi mogu sintetizirati inhibitore endonukleaza ili ukloniti vlastite sekvence koje bi endonukleaze prepoznale. Bakterije mogu pohraniti informaciju o kontaktu s bakteriofagom pomoću CRISPR-Cas sustava. Kratki fragmenti DNA virusa se pohranjuju između ponavljajućih sekvenci genoma bakterije. Nakon transkripcije nastaju kratke RNA na koje se vežu Cas proteini. Nastaje kompleks koji će prepoznati stranu DNA koju će zatim degradirati endonukleaze. Bakteriofagi mogu sintetizirati inhibitore CRISPR-Cas sustava (Bondy-Denomy i sur., 2015; Samson i sur., 2013; Labrie i sur., 2010).

Prednosti terapije bakterijskih infekcija bakteriofagima su:

- specifičnost
- samoograničenje
- brži i jeftiniji razvoj od antibiotika

- minimalan štetan učinak na mikrobiotu i manje neželjenih učinaka
- minimalan štetan učinak na okoliš
- manji potencijal indukcije rezistencije od antibiotika
- raznolikost farmaceutskog oblika i puta primjene
- utjecaj na biofilm

Potencijalni nedostaci terapije bakterijskih infekcija bakteriofagima su:

- selekcija faga
- specifičnost
- potencijalni učinak na imunološki sustav
- stabilnost
- nedovoljno dokaza
- nepovjerenje prema virusima

(Loc-Carrillo i Abedon, 2011).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Povećana svijest o rezistenciji bakterija na antibiotike potaknula je istraživanja terapijskih mogućnosti za tretiranje rezistentnih bakterijskih infekcija kao zamjenu ili dopunu postojećoj antibiotskoj terapiji. Među njih spada i terapija bakteriofagima, virusima koji mogu inficirati i ubiti bakterije. Ovim istraživanjem istražili smo stavove i mišljenja liječnika o terapiji bakteriofagima kao alternativni za liječenje bakterijskih infekcija.

Ciljevi ovog istraživanja bili su razviti i validirati upitnik koji će:

- 1) Istražiti stavove liječnika o problemu bakterijske rezistencije (Odjeljak 2 upitnika)
- 2) Istražiti upućenost i stavove liječnika o alternativama antibioticima u prevenciji i liječenju bakterijskih infekcija (Odjeljak 3 upitnika)
- 3) Istražiti stavove i mišljenje liječnika o terapiji bakterijskih infekcija bakteriofagima (Odjeljak 4 upitnika), a što uključuje:
 - a. Povjerenje prema terapiji bakteriofagima (stav i mišljenje o sigurnosti i učinkovitosti terapije bakteriofagima)
 - b. Mišljenje o prednostima i nedostacima terapije bakteriofagima
 - c. Način informiranja o terapiji bakteriofagima

Istraživanje je također imalo za cilj istražiti jesu li određene karakteristike ispitanika (socio-demografski parametri, specijalizacija i znanstveni stupanj) povezane s istraživanim stavovima i mišljenjem liječnika o problemu bakterijske rezistencije i alternativnim načinima liječenja infekcija.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

U istraživanju su sudjelovali zainteresirani liječnici na području Republike Hrvatske čije su e-mail adrese javno dostupne na internetu. Tijekom pilot testiranja su uključeni liječnici neovisno o specijalizaciji, a tijekom istraživanja su uključeni liječnici primarno obiteljske medicine i specijalisti kliničke mikrobiologije.

3.2. Instrument za prikupljanje podataka

Za potrebe ovog istraživanja korišten je kvantitativni pristup prikupljanja podataka pomoću validiranog upitnika (Prilog 9.1.).

Upitnik je podijeljen u četiri odjeljka s obzirom na ciljeve istraživanja te se konačna verzija upitnika sastoji od 40 čestica.

Prvi odjeljak upitnika sastoji se od deset čestica u svrhu prikupljanja sociodemografskih podataka. Prikupljani su sljedeći podaci:

- Spol
- Dob
- Mjesto rođenja
- Mjesto studiranja
- Bračno stanje
- Stručni stupanj
- Specijalizacija
- Znanstveni stupanj/Znanstveno-nastavno zvanje
- Radno mjesto
- Dužina ukupnog radnog staža

U drugom se odjeljku istražuje stav liječnika o problemu bakterijske rezistencije. Sastavljen je od pet čestica s ponuđenim odgovorima na skali Likertova tipa od 1 do 5 (uopće se ne slažem, ne slažem se, niti se slažem niti ne slažem, slažem se, slažem se u potpunosti).

Treći se odjeljak sastoji od devet čestica pomoću kojih se istražuje upućenost i stav liječnika o alternativama antibioticima (protutijela, probiotici, bakteriofagi, lizini bakteriofaga, antimikrobni peptidi, imunostimulirajući produkti, cjepiva). U prvom je pitanju bilo potrebno zaokružiti alternative antibioticima s kojima je ispitanik upoznat, a u drugom iste ocijeniti na skali Likertova tipa od 1 do 5 (uopće ih ne smatram obećavajućima, ne smatram ih obećavajućima, niti da niti ne, smatram ih obećavajućima, u potpunosti ih smatram obećavajućima).

U četvrtom se odjeljku ispituju stavovi i mišljenja liječnika o bakteriofagima. Sastoji se od 16 čestica. Odjeljak započinje s 12 izjava na koje ispitanici mogu odgovoriti tvrdnjama od „uopće se ne slažem“ do „u potpunosti se slažem“ pomoću kojih ispitujemo njihove stavove o sigurnosti i učinkovitosti bakteriofaga. Slijede pitanja o prednostima i nedostacima te načinu informiranja o navedenoj terapiji.

Upitnik završava otvorenim pitanjem u kojem se ispitanici pozivaju da ostave dodatne komentare na temu.

3.3. Protokol

Istraživanje je dizajnirano kao presječno istraživanje validiranim upitnikom. Provodilo se u Republici Hrvatskoj od studenog 2017. do travnja 2018. godine. Odgovori su prikupljeni putem on-line upitnika poslanih elektronskom poštom uz molbu za sudjelovanje (Prilog 9.2.) na javno dostupne e-mail adrese liječnika obiteljske medicine i specijalista kliničke mikrobiologije, te prosljeđivanjem molbe od strane nekoliko stručnih društava (Hrvatsko društvo za kliničku mikrobiologiju, Koordinaciji liječnika hrvatske obiteljske medicine (KoHOM)), Hrvatske ljekarničke komore i Gradskog ureda za zdravstvo u Zagrebu. Nakon tjedan dana slani su podsjetnici, također putem e-maila.

Ispunjavanje upitnika trajalo je oko 5 minuta. Anonimnost je bila osigurana on-line upitnikom kojim se ne bilježi e-mail adresa ispitanika. Pristup prikupljenim podacima imali su samo provodioci istraživanja te su se podaci koristili isključivo za potrebe ovog istraživanja i izradu diplomskog rada.

U sličnim istraživanjima prosječan postotak odgovora je iznosio 30% (Draper i sur., 2017; Navarro-San Francisco i sur., 2010; Alcantara, 2012; Srinivasan i sur., 2004) te je stoga planirani broj poslanih upitnika bio veći od 300 kako bi postigli ciljani minimalni prikupljeni broj odgovora (100).

Sveukupno je poslano 635 upitnika, više nego prvobitno planirano radi manjeg odaziva.

Odgovorilo je 162 ispitanika. Prosječan postotak odgovora bio je 25,5%.

3.4. Izrada upitnika

Pretragom dostupne literature utvrđeno je da do sada nisu provedena ovakva istraživanja o primjeni bakteriofaga u liječenju bakterijskih infekcija te je stoga odlučeno izraditi upitnik. Za izradu upitnika bilo je potrebno postaviti jasne ciljeve te pretražiti literaturu za svaki pojedini cilj. Istraživanje stavova liječnika o problemu bakterijske rezistencije (Odjeljak 2 upitnika) temeljeno je na istraživanju Wester-a i suradnika iz 2002. godine. Pri izradi Odjeljka 3 upitnika kojim istražujemo upućenost i stavove liječnika o alternativama antibioticima u liječenju bakterijskih infekcija korišten je članak Czaplewskog i suradnika iz 2016. U izradi Odjeljka 4 upitnika (Istraživanje stavova i mišljenja liječnika o terapiji bakterijskih infekcija bakteriofagima) korišten je članak koji su napisali Loc-Carrillo i Abedon, 2011. Upitnik je izrađen prema kriterijima za prikupljanje podataka u kvantitativnim istraživanjima u zdravstvu (Bowling, 2002).

3.5. Obrada podataka

Prilikom obrade stavova liječnika o problemu bakterijske rezistencije (Odjeljak 2 upitnika; Skala 1) stupnjevi Likertove skale su kodirani brojevima od 1 do 5, pri čemu je broj 5 označavao najpozitivniji stav, a broj 1 najnegativniji tesu bodovi za svaku od pet čestica zbrajani pri čemu je minimalna suma mogla biti pet (1x5), a maksimalna 25 (5x5). Ispitanici su prema ukupnom zbroju bodova bili podijeljeni u tri skupine ovisno o razini zabrinutosti problemom rezistencije: slabo (≤ 10 bodova), srednje (11-20 bodova) i jako (≥ 21 bodova) zabrinuti problemom rezistencije.

Tijekom obrade stavova liječnika o bakteriofagima (Odjeljak 4 upitnika; Skala 2) bilo je potrebno svaku izjavu karakterizirati kao pokazatelj pozitivnog ili negativnog stava prema bakteriofagima. Stupnjeve negativnih izjava je bilo potrebno obrnuto kodirati (1=u potpunosti se slažem, 5=uopće se ne slažem). Neodgovorene izjave su kodirane nulom. Negativan stav prema bakteriofagima su pokazivale izjave: „Terapija bakteriofagima može biti prijetnja za javno zdravstvo“, „Učinkovitost terapije bakteriofagima je isključivo posljedica placebo učinka“ i „Terapija bakteriofagima bi trebala bit dostupna isključivo kao alternativna terapija na teret pacijenta“. Pozitivan stav prema bakteriofagima su pokazivale izjave: „Terapija

bakteriofagima je sigurnija od antibiotske terapije“, „Terapija bakteriofagima je jednako učinkovita kao antibiotska terapija“, „Terapija bakteriofagima bi trebala biti dostupna u praksi i moguća za propisivanje od strane liječnika“, „Htio/Htjela bih dobiti više informacija o terapiji bakteriofagima“, „Pacijenti bi trebali imati mogućnost izbora u odabiru terapije bakteriofagima“, „Zdravstveni djelatnici bi trebali moći informirati pacijenta o terapiji bakteriofagima“ i „Znanstvene spoznaje o terapiji bakteriofagima bi trebale biti više zastupljene u obrazovanju (diplomskom studiju/stručnom usavršavanju)“. Neutralnim su ocijenjene izjave: „Terapija bakteriofagima se ne bi trebala razmatrati sve dok nema dovoljno dokaza na najvišoj razini (randomizirane kliničke studije)“ i „Smatram da ne znam dovoljno o terapiji bakteriofagima“. Sve izjave bile su kodirane prema Likertovoj skali bodovima od 1 do pet koji su potom zbrojeni. Najmanja moguća suma iznosi nula, a najveća 48. Prema sumi ispitanici su podijeljeni u četiri skupine: ispitanici koji nisu odgovorili (nula bodova), ispitanici s negativnim stavom o bakteriofagima (1-20 bodova), ispitanici koji nemaju niti negativan niti pozitivan stav prema bakteriofagima (21-40 bodova) te ispitanici s pozitivnim stavom o bakteriofagima (≥ 41 bodova).

3.5.1. Validacija upitnika

U svrhu validacije upitnika procjenjivana je unutarnja konzistentnost. Unutarnja konzistentnost se definira kao konzistentnost rezultata testa i osigurava da različita pitanja daju konzistentne rezultate. Unutarnja konzistentnost je izračunata za Skale 1 i 2 pomoću koeficijenta Cronbach Alpha i prosječne Inter-Item korelacije. Koeficijent Cronbach alpha određuje unutarnju konzistentnost i prosječnu korelaciju pitanja u upitniku. Vrijednosti veće od 0,70 ukazuju na prihvatljive rezultate (Bland i Altman, 1986).

3.5.2. Statistička analiza podataka

U svrhu analize podataka korišten je program IBM SPSS, verzija 22.0. (Armonk, NY: IBM Corp.). U opisu karakteristika, stavova i mišljenja ispitanika koristile su se metode deskriptivne statistike. Kao mjere središnje tendencije i varijabilnosti korišteni su prosjek i standardna devijacija u slučajevima normalne razdiobe ili medijan i interkvartilni raspon u slučajevima kada je razdioba odstupala od normalne. Kategorijski podaci prikazani su kao apsolutni i relativni broj (postotak).

U svrhu validacije upitnika izračunata je Chronbachova alpha vrijednost za skale 1 i 2. Za testiranje razlika između dviju skupina korišten je studentov t test, a za usporedbu više od dviju skupina korištena je ANOVA, uz post hoc LSD test. Kategorijski podaci analizirani su hi-kvadrat testom. Vrijednost $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom.

4. REZULTATI

4.1. Opće karakteristike ispitanika

U ispitivanju je ukupno sudjelovalo 162 ispitanika, među kojima su većinu činile žene (n=130; 80,2%). Najviše ispitanika je rođeno u Zagrebu (n=48; 30,4%), a 59,4% (n=95) je i studiralo u Zagrebu. 56,2% ispitanika (n=91) je oženjeno, odnosno udano.

Medijan i interkvartilni raspon (IKR) godina iznosio je 40 (22) godina, dok se raspon godina kretao od 25 do 64. godine.

Među sudionicima, skoro polovica su liječnici specijalisti (n=73; 45,1%), a među njima je 31,6 % (n=49) specijaliziralo obiteljsku medicinu, a 12,9% (n=20) kliničku mikrobiologiju. 38,7% (n=60) čine liječnici bez specijalizacije. Ispitanici uglavnom nemaju nikakav znanstveni stupanj ili znanstveno-nastavno zvanje (n=143; 88,3%). Najviše ispitanika radi u ordinaciji (n=104; 65,8%), a zatim u bolnici (n=21; 13,3%).

Dužina ukupnog radnog staža je bila od 0,5 do 39 godina, medijan 12,5 godina i interkvartilni raspon 22 godine.

TABLICA 4.1. Demografski podaci

SPOL	n	%
Muško	32	19,8
Žensko	130	80,2
MJESTO ROĐENJA	n	%
Zagreb	48	30,4
Rijeka	14	8,9
Inozemstvo	14	8,9
Split	14	8,9
Osijek	10	6,3
Zadar	9	5,7
MJESTO STUDIRANJA	n	%
Zagreb	95	59,4
Rijeka	41	25,6
Osijek	11	6,9
Split	8	5,0

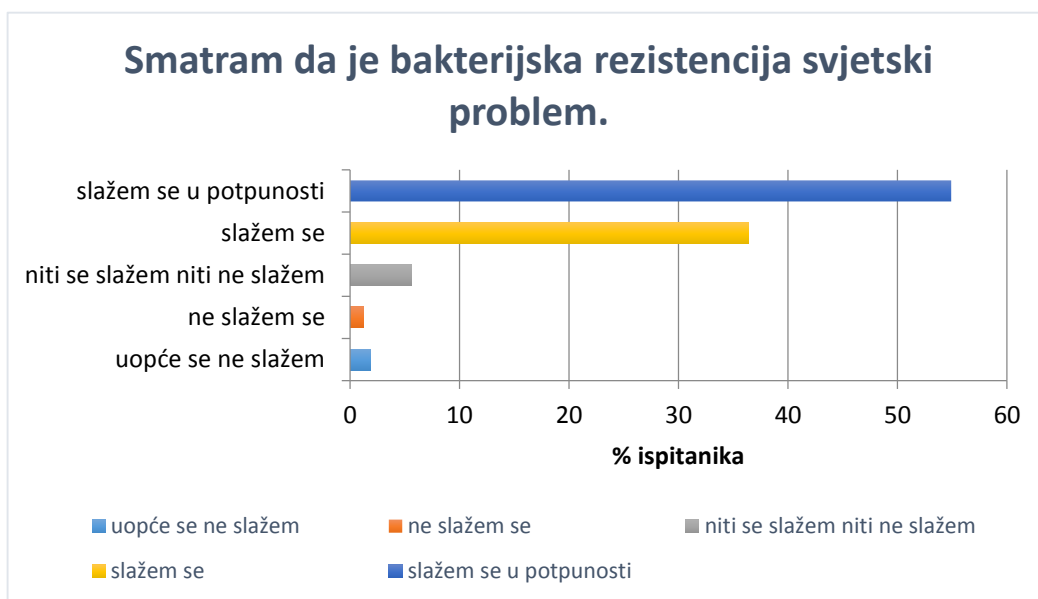
Inozemstvo	5	3,1
BRAČNO STANJE	n	%
Oženjen/udana	91	56,2
Neoženjen/neudana	58	35,8
Vanbračna zajednica	6	3,7
Rastavljen/a	6	3,7
Udovac/udovica	1	0,6
STRUČNI STUPANJ	n	%
Liječnik bez specijalizacije	60	37,0
Liječnik na specijalizaciji	29	17,9
Liječnik specijalist	73	45,1
SPECIJALIZACIJA	n	%
Obiteljska medicina	49	31,6
Klinička mikrobiologija	20	12,9
Bez specijalizacije	60	38,7
Ostalo	26	16,8
ZNANSTVENI STUPANJ / ZNANSTVENO- NASTAVNO ZVANJE	n	%
Bez	143	88,3
Mr.sc.	5	3,1
Dr.sc.	5	3,1
Doc.dr.sc./znanstv. suradnik	5	3,1
Prof.dr.sc./znanstveni savjetnik	3	1,9
Izvanredni prof.dr.sc./viši znanstv.suradnik	1	0,6
RADNO MJESTO	n	%
Bolnica	21	13,3
Ordinacija	104	65,8
Klinika	9	5,7
Fakultet	5	3,2

4.2. Validacija

Skala 1 i Skala 2 pokazale su visoke vrijednosti unutarnje pouzdanosti tipa Cronbach alpha (0,882 i 0,924).

4.3. Stavovi liječnika o problemu rezistencije na antibiotike

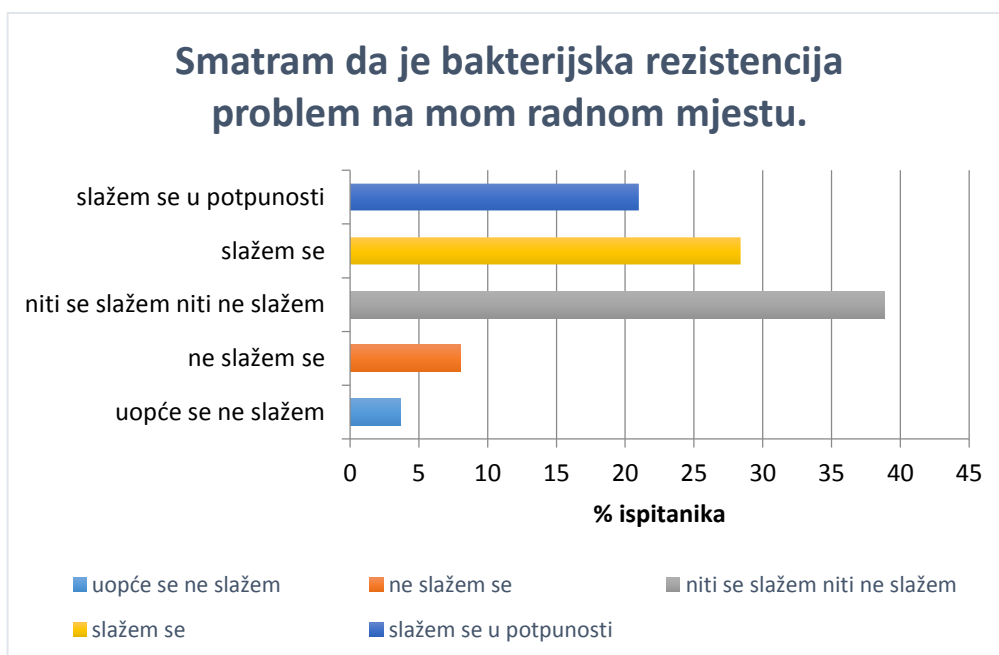
91,3 % (n=148) liječnika se slaže, odnosno u potpunosti slaže, da je rezistencija bakterija na antibiotike svjetski problem (Slika 4.1.). 140 (86,4%) ispitanika smatra da je bakterijska rezistencija na antibiotike problem u Hrvatskoj (Slika 4.2.). Približno polovica ispitanika (n=80; 49,4%) smatra da je bakterijska rezistencija problem na njihovom radnom mjestu (Slika 4.3.). 93,2% ispitanika (n=151) smatra da će bakterijska rezistencija biti veći problem u budućnosti (Slika 4.4.). Većinu ispitanika (n=139; 85,8%) zabrinjava budućnost liječenja bakterijskih infekcija (Slika 4.5.).



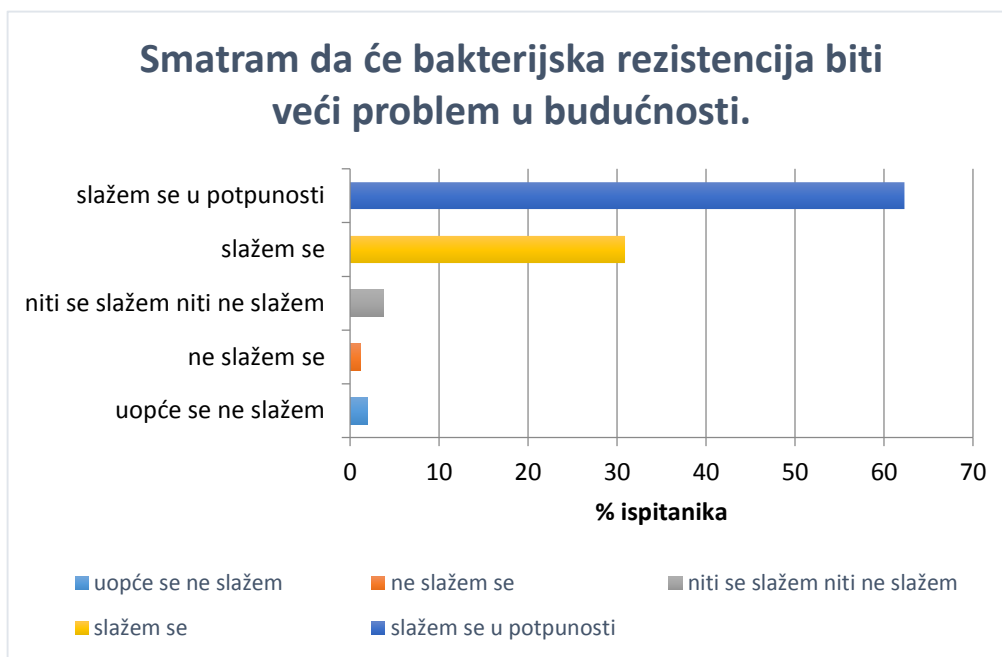
Slika 4.1. Prikaz stavova liječnika o bakterijskoj rezistenciji kao svjetskom problemu.



Slika 4.2. Prikaz stavova liječnika o bakterijskoj rezistenciji u Hrvatskoj.



Slika 4.3. Prikaz stavova liječnika o bakterijskoj rezistenciji na radnom mjestu.



Slika 4.4. Prikaz stavova liječnika o bakterijskoj rezistenciji u budućnosti.



Slika 4.5. Prikaz stavova liječnika o budućnosti liječenja bakterijskih infekcija.

Podaci dobiveni Likertovom skalom su obrađeni kako je objašnjeno u poglavlju 3.4. Zbrajani su odgovori za svaku od izjava pri čemu je minimalna suma mogla biti pet, a maksimalna 25 pri čemu je niža vrijednost značila manju zabrinutost rezistencijom bakterija na antibiotike.

U prvu skupinu (najmanje zabrinuti ispitanici) spadaju samo 3 osobe (1,9%), u drugu skupinu spadaju (srednje zabrinuti ispitanici) 64 osobe (39,5%), a u treću (najviše zabrinuti ispitanici) 95 osoba (58,6%).

Tablica 4.2. Stav liječnika o rezistenciji bakterija na antibiotike

Stupanj zabrinutosti rezistencijom na antibiotike	n	%
Slabo (5-10 bodova)	3	1,9
Srednje (11-20 bodova)	64	39,5
Jako (21-25 bodova)	95	58,6

Prikazani stavovi liječnika o rezistenciji bakterija na antibiotike nisu ovisili o dobi, znanstvenom stupnju, bračnom stanju i dužini radnog staža ($p>0,05$). Od svih proučavanih varijabli, jedino se specijalizacija pokazala povezanom sa stupnjem zabrinutosti zbog rezistencije ($p=0,021$), specijalisti kliničke mikrobiologije su izrazili veću zabrinutost zbog rezistencije ($22,8 \pm 2,6$) nego liječnici ostalih specijalizacija ($20,7 \pm 3,8$).

Dodatno smo analizirali mišljenja liječnika koji rade u bolnici i liječnika obiteljske medicine. 95% ($n=19$) liječnika koji rade u bolnici smatra da je rezistencija svjetski problem, 90 % ($n=18$) smatra da je rezistencija problem u Hrvatskoj, 60 % ($n=12$) smatra da je rezistencija problem na njihovom radnom mjestu, svi ($n=20$) smatraju da će rezistencija biti veći problem u budućnosti i 90 % ($n=18$) zabrinjava budućnost liječenja bakterijskih infekcija. 89,8% ($n=44$) liječnika obiteljske medicine smatra da je rezistencija svjetski problem, problem u Hrvatskoj te da će u budućnosti biti veći problem, 51 % ($n=25$) smatra da je rezistencija problem na njihovom radnom mjestu te 81,6 ($n=40$) zabrinjava budućnost liječenja bakterijskih infekcija.

4.4. Upućenost i stavovi liječnika o alternativama antibioticima

Ispitanici su u ovom odjeljku upitnika odabirali s kojim su alternativama antibioticima upoznati. Najviše ispitanika je upoznato s probioticima ($n=122$; 75,3%), cjepivima ($n=100$; 61,7%) i protutijelima ($n=64$; 39,5%). S bakteriofagima je upoznato 25,9 % ($n=42$).

Tablica 4.3. Upoznatost liječnika s alternativama antibioticima.

Alternativa antibioticima	n	%
Probiotici	122	75,3
Cjepiva	100	61,7
Protutijela	64	39,5
Bakteriofagi	42	25,9
Imunostimulirajući produkti	38	23,5
Antimikrobni peptidi	21	13
Niti jedna	20	12,3
Lizini bakteriofaga	19	11,7

Nakon toga, ispitanici, koji su upoznati s navedenim alternativama antibioticima, dali su svoje mišljenje koje su od tih terapija obećavajuće. Prema mišljenju ispitanika najviše obećavaju cjepiva (48,8%), protutijela (35,2%), probiotici (33,9%) i bakteriofagi (32,7%).

Tablica 4.4. Prikaz broja i postotka ispitanika koji su smatrali obećavajućim/u potpunosti obećavajućim pojedinu alternativu antibioticima.

Alternativa antibioticima	n	%
Cjepiva	79	48,8
Protutijela	57	35,2
Probiotici	55	33,9
Bakteriofagi	53	32,7
Imunostimulirajući produkti	44	27,2
Antimikrobni peptidi	30	18,6
Lizini bakteriofaga	27	16,7

4.5. Stavovi i mišljenja liječnika o terapiji bakteriofagima

Polovica ispitanika se ne slaže niti slaže da je terapija bakteriofagima sigurnija od antibiotika (n=81).

Jednaki postotak ispitanika (10,5%) smatra da je terapija bakteriofagima jednako učinkovita i nije jednako učinkovita kao antibiotici.

Više ispitanika smatra da terapija bakteriofagima ne bi bila prijetnja za javno zdravstvo nego da bi bila. Većina ne može odlučiti (45,1%; n=73).

32,7% (n=53) ispitanika ne smatra učinkovitost terapije bakteriofagima posljedicom placebo učinka.

Četvrtina ispitanika smatra da bi terapija bakteriofagima trebala biti dostupna u praksi i moguća za propisivanje od strane liječnika (n=39; 24,1%).

Četvrtina ispitanika smatra da terapija bakteriofagima ne bi trebala biti isključivo dostupna kao alternativna terapija na teret pacijenata (24,1%, n=39).

Više od trećine ispitanika (n=61; 37,6%) smatra bi pacijenti trebali imati mogućnost izbora u odabiru terapije bakteriofagima.

Većina ispitanika (n=132; 81,5%) želi dobiti više informacija o terapiji bakteriofagima (Slika 4.6.).

Više od polovice ispitanika (n=91; 56,2%) smatra da se terapija bakteriofagima ne bi trebala razmatrati sve dok nema dovoljno dokaza na najvišoj razini (randomizirane kliničke studije) (Slika 4.7.).

71% ispitanika (n=115) smatra da bi zdravstveni djelatnici trebali moći informirati pacijenta o terapiji bakteriofagima (Slika 4.8.).

Većina se ispitanika (n=120; 74%) slaže da bi znanstvene spoznaje o terapiji bakteriofagima trebale biti više zastupljene u obrazovanju (diplomskom studiju/stručnom usavršavanju) (Slika 4.9.).

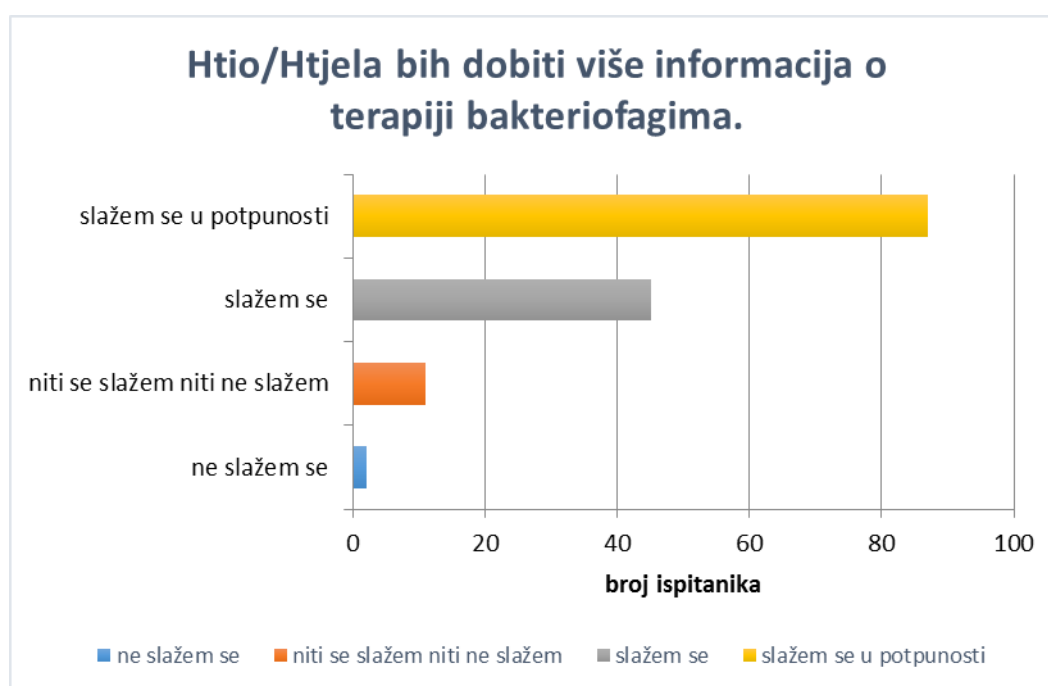
77,1% (n=125) ispitanika smatra da ne zna dovoljno o terapiji bakteriofagima (Slika 4.10.).

Tablica 4.5. Prikaz stavova liječnika o terapiji bakteriofagima

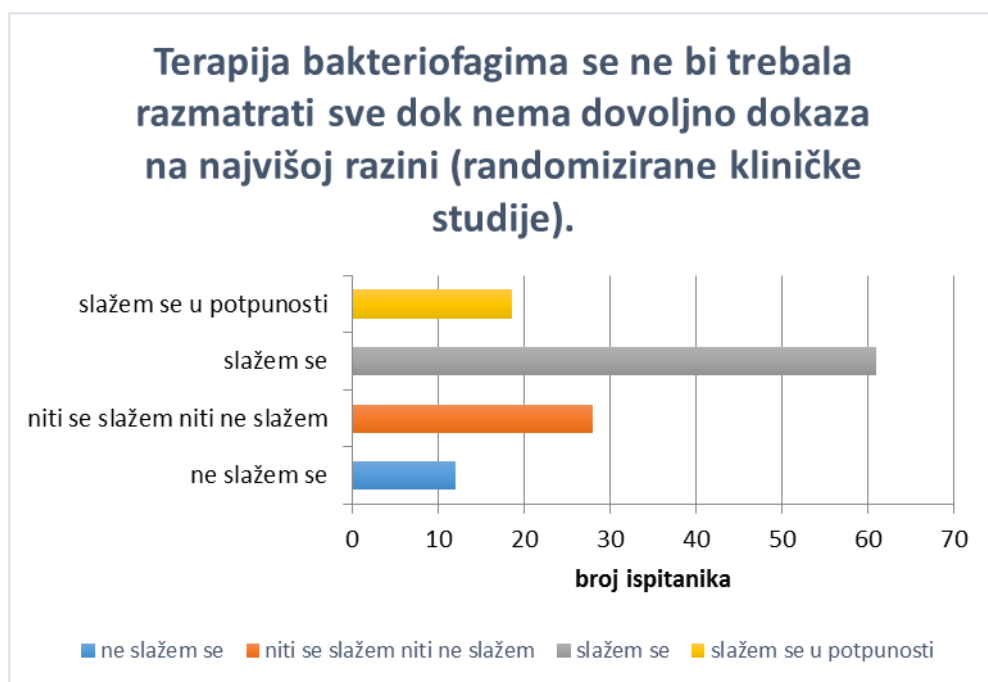
Pitanje	Uopće se ne slažem. (%)	Ne slažem se. (%)	Niti se slažem niti ne slažem. (%)	Slažem se. (%)	U potpunosti se slažem. (%)
Terapija bakteriofagima je sigurnija od antibiotske terapije.	1,2	10,5	50,0	9,9	0,5
Terapija bakteriofagima je jednako učinkovita kao antibiotska terapija.	0,6	9,9	51,9	9,3	1,2

Terapija bakteriofagima može biti prijetnja za javno zdravlje.	3,1	18,5	45,1	3,1	/
Učinkovitost terapije bakteriofagima je isključivo posljedica placebo učinka.	4,9	27,8	36,4	0,6	/
Terapija bakteriofagima bi trebala biti dostupna u praksi i moguća za propisivanje od strane liječnika.	0,6	6,8	40,1	21,6	2,5
Terapija bakteriofagima bi trebala biti dostupna isključivo kao alternativna terapija na teret pacijenta.	6,8	17,3	40,7	4,3	1,2
Htio/Htjela bih dobiti više informacija o terapiji bakteriofagima.	/	1,2	6,8	27,8	53,7
Terapija bakteriofagima se ne bi trebala razmatrati sve dok nema dovoljno dokaza na najvišoj razini (randomizirane kliničke studije).	/	7,4	17,3	37,7	18,5
Pacijenti bi trebali imati mogućnost izbora	2,5	13,0	24,1	29,6	8,0

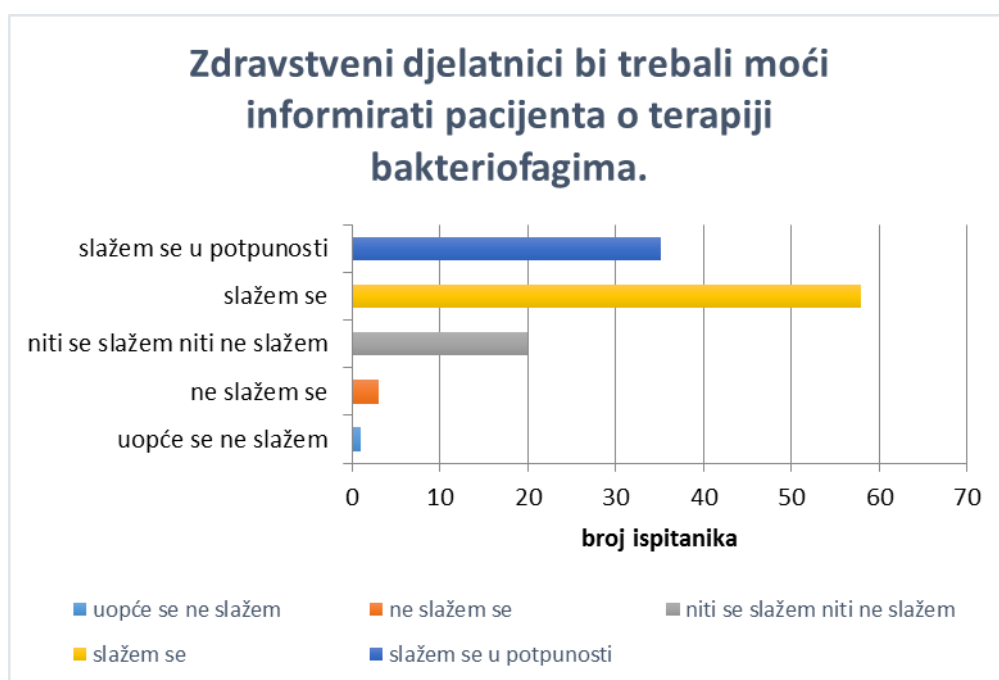
u odabiru terapije bakteriofagima.					
Zdravstveni djelatnici bi trebali moći informirati pacijenta o terapiji bakteriofagima.	0,6	1,9	12,3	35,8	35,2
Znanstvene spoznaje o terapiji bakteriofagima bi trebale biti više zastupljene u obrazovanju (diplomskom studiju/stručnom usavršavanju).	/	1,2	11,1	43,8	30,2
Smatram da ne znam dovoljno o terapiji bakteriofagima.	3,1	3,7	7,4	26,5	50,6



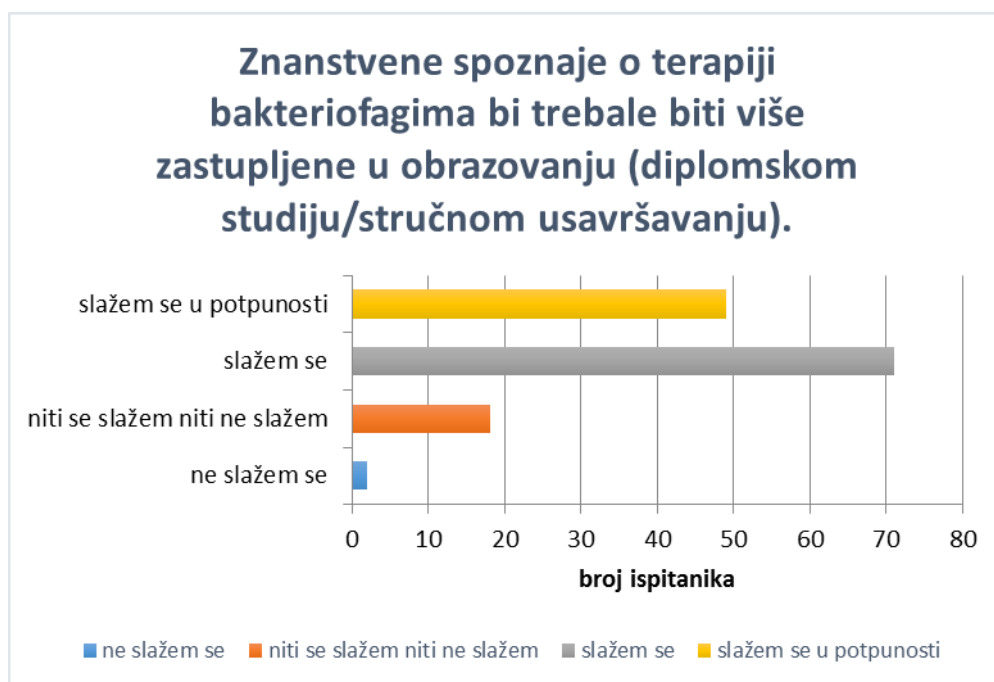
Slika 4.6. Prikaz želja liječnika o informiranju u vezi terapije bakteriofagima.



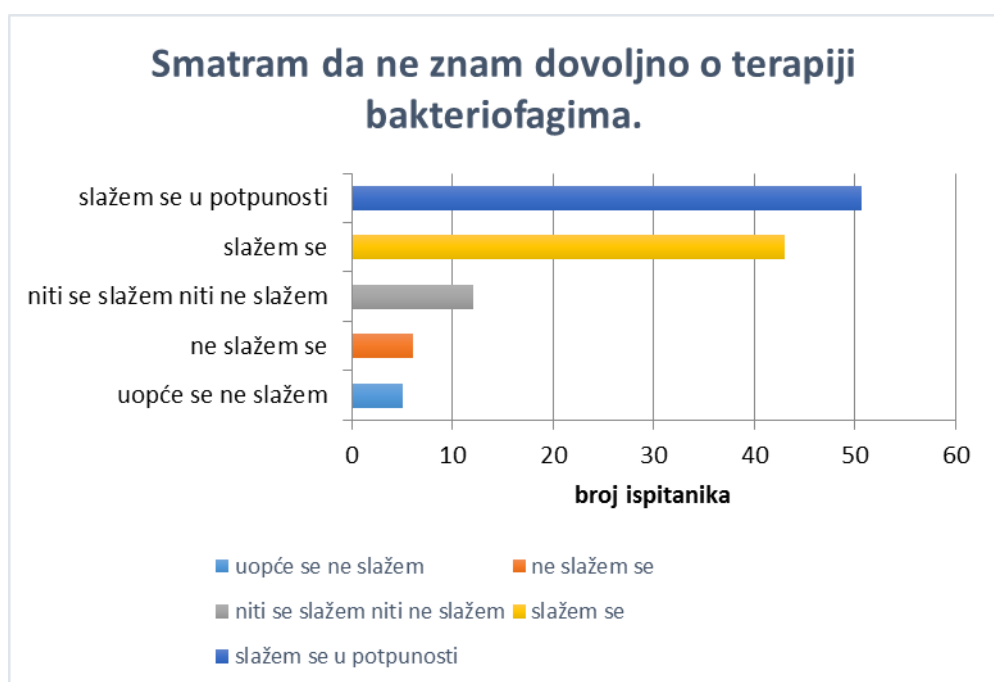
Slika 4.7. Prikaz mišljenja liječnika o razmatranju terapije bakteriofagima bez randomiziranih kliničkih studija.



Slika 4.8. Prikaz mišljenja liječnika o pravu informiranja pacijenata o terapiji bakteriofagima.



Slika 4.9. Prikaz mišljenja liječnika o potrebi zastupljenosti znanstvenih spoznaja o terapiji bakteriofagima u obrazovanju.



Slika 4.10. Prikaz mišljenja liječnika o vlastitom znanju o terapiji bakteriofagima.

Većina ispitanika nije sigurno da li bi preporučili terapiju bakteriofagima svojim pacijentima (n=127; 78,4%) (Tablica 4.6.).

Tablica 4.6. Prikaz broja i postotka liječnika koji bi preporučili terapiju bakteriofagima

	n	%
Da	31	19,1
Ne	4	2,5
Nisam siguran/sigurna	127	78,4

Ispitanici su prepoznali manji potencijal indukcije rezistencije, specifičnost i minimalan štetan učinak na mikrobiotu kao glavne prednosti bakteriofaga (Tablica 4.7.).

Tablica 4.7. Prikaz mišljenja ispitanika o glavnim prednostima bakteriofaga.

Prednost	n	%
Manji potencijal indukcije rezistencije (od antibiotika)	51	31,5
Specifičnost	36	22,2
Minimalan štetan učinak na mikrobiotu	32	19,8
Brži i jeftiniji razvoj od razvoja novih antibiotika	15	9,3
Samoograničenje	10	6,2
Minimalan štetan učinak na okoliš	7	4,3

Ispitanici su prepoznali nedovoljno dokaza, potencijalnu interakciju s imunološkim sustavom i nepovjerenje javnosti kao glavne nedostatke terapije bakteriofagima (Tablica 4.8.).

Tablica 4.8. Prikaz mišljenja ispitanika o glavnim nedostacima bakteriofaga.

Nedostatak	n	%
Nedovoljno dokaza	50	30,9
Potencijalna interakcija s imunološkim sustavom	40	24,7
Nepovjerenje javnosti	20	12,3
Selekcija faga	11	6,8
Specifičnost	11	6,8

Stabilnost	10	6,2
------------	----	-----

Najveći broj ispitanika upoznatih s terapijom bakteriofagima, informirao se putem interneta (n=49, 30,2%) (Tablica 4.9.).

Tablica 4.9. Prikaz glavnih načina informiranja ispitanika o terapiji bakteriofagima.

Način informiranja	n	%
Internet	49	30,2
Stručna literatura	20	12,3
Stručni skup	12	7,4
Suradnici s posla	4	2,5
Nisu upoznati s terapijom bakteriofagima	100	61,7

Podaci dobiveni Likertovom skalom vezana uz mišljenje liječnika o bakteriofagima su obrađeni kako je objašnjeno u poglavlju 3.4. Zbrojem odgovora na ovaj odjeljak dobivene su sume prema kojima su liječnici podijeljeni u 4 skupine (liječnici koji nisu odgovorili=1, liječnici s negativnim stavom=2, liječnici s neutralnim stavom=3, liječnici s pozitivnim stavom=4).

10 ispitanika nije odgovorilo na izjave (6,2%). Negativan stav prema bakteriofagima je izrazilo 34 liječnika (21%). Niti pozitivan niti negativan stav je imalo 108 liječnika (66,7%), a pozitivan 10 liječnika (6,2%) (tablica 4.10.).

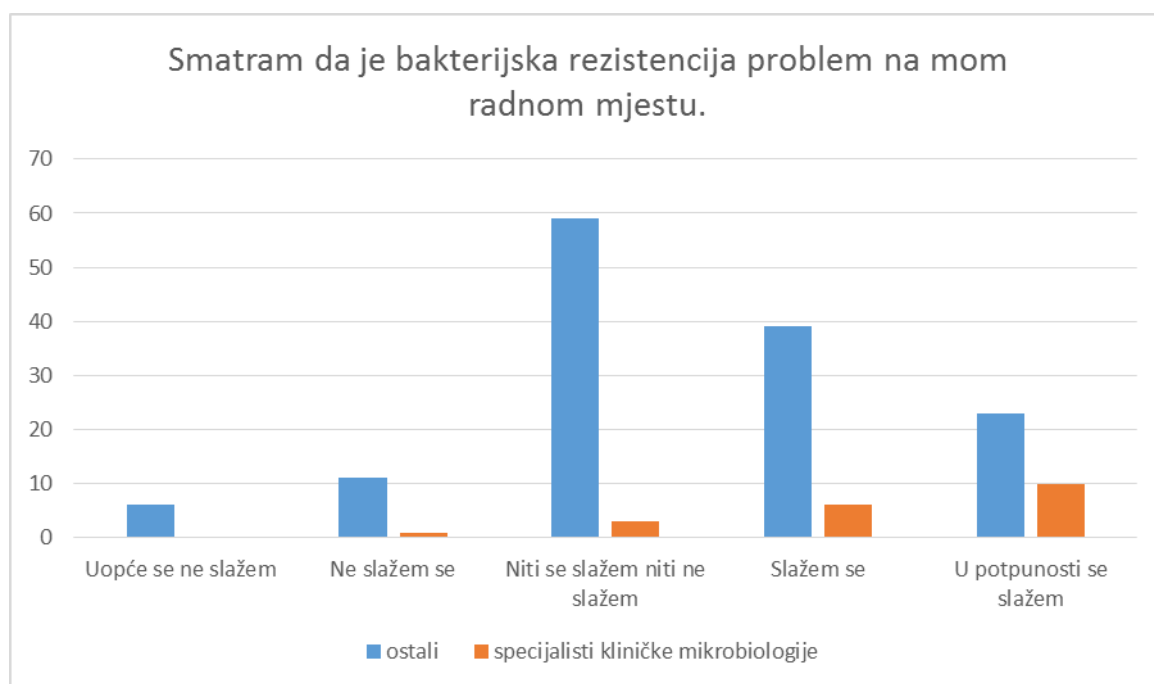
Tablica 4.10. Prikaz ukupnog rezultata stavova liječnika o terapiji bakteriofagima

Stav o bakteriofagima	n	%
Negativan (1-20 bodova)	34	21,0
Neutralan (21-40bodova)	108	66,7
Pozitivan (41-48 bodova)	10	6,2
Nepoznat (0 bodova)	10	6,2

4.6. Povezanost karakteristika ispitanika sa stavovima o bakterijskoj rezistenciji i alternativama antibioticima

Ovaj rad je dodatno istražio povezanost liječničkog stava o terapiji bakteriofagima sa socio-demografskim karakteristikama ispitanika pri čemu se pokazalo da stavovi liječnika o bakteriofagima nisu ovisili o dobi, specijalizaciji, znanstvenom stupnju, bračnom stanju ili ukupnom radnom stažu ($p>0,05$).

Također se pokazalo da ne postoji povezanost liječničke specijalizacije sa stavovima o problemu bakterijske rezistencije u svijetu i Hrvatskoj kao niti sa stavovima o budućnosti bakterijske rezistencije i liječenja bakterijskih infekcija. Međutim, kao što je za očekivati, pokazalo se da su specijalisti kliničke mikrobiologije za razliku od ostalih ispitanika više zabrinuti zbog bakterijske rezistencije na svom radnom mjestu ($p=0,008$) što je prikazano na slici 4.11.



Slika 4.11. Prikaz povezanosti specijalizacije i mišljenja liječnika o problemu bakterijske rezistencije na radnom mjestu.

4.7. Povezanost specijalizacije liječnika i poznavanja alternativa antibioticima

Nije ustanovljena značajna razlika u poznavanju alternativa antibioticima između liječnika s različitim specijalizacijama ($p>0,05$), osim u slučaju bakteriofaga. Udio specijalista kliničke mikrobiologije koji su bili upoznati s terapijom bakteriofaga bio je značajno viši nego drugih

liječnika u ovome istraživanju ($p=0,001$). 11 od 20 (55,0%) specijalista kliničke mikrobiologije, a samo 29 od 138 (21,0%) ostalih ispitanika je bilo upoznato s terapijom bakteriofagima.

5. RASPRAVA

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem prikazuju stavove i mišljenja liječnika u Republici Hrvatskoj o problemu rezistencije bakterija na antibiotike i o alternativama antibioticima s naglaskom na terapiju bakteriofagima.

5.1. Rezistencija bakterija na antibiotike

Prema ovom istraživanju, 91,3% (n=148) liječnika smatra da je bakterijska rezistencija svjetski problem, 86,4% (n=140) smatra da je bakterijska rezistencija problem u Hrvatskoj, a 49,4% (n=80) liječnika smatra da je rezistencija problem na njihovom radnom mjestu. 93,2% (n=151) liječnika smatra da će bakterijska rezistencija biti veći problem u budućnosti, a 85,8% (n=139) liječnika zabrinjava budućnost liječenja bakterijskih infekcija. 58,6% (n=95) liječnika je sveukupno izrazilo visoku zabrinutost o problemu rezistencije bakterija na antibiotike.

Mišljenja i stavovi liječnika i drugih zdravstvenih radnika o rezistenciji bakterija na antibiotike opsežno su ispitivani u raznim istraživanjima koje ću ovdje navesti kronološkim redom. Potrebno je uzeti u obzir da su ova istraživanja pretežito provedena u bolnicama ili ordinacijama liječnika obiteljske medicine.

Prema podacima našeg istraživanja prikazanih u rezultatima 95% (n=19) liječnika koji rade u bolnici smatra da je rezistencija svjetski problem, 90 % (n=18) smatra da je rezistencija problem u Hrvatskoj, a 60 % (n=12) smatra da je rezistencija problem na njihovom radnom mjestu.

89,8% (n=44) liječnika obiteljske medicine smatra da je rezistencija svjetski problem, problem u Hrvatskoj 51 % (n=25) smatra da je rezistencija problem na njihovom radnom mjestu. Wester i suradnici su 1999. godine u bolnicama u Chicagu proveli istraživanje percepcije liječnika o rezistenciji bakterija na antibiotike. Liječnici su u ovom istraživanju percipirali bakterijsku rezistenciju kao veoma važan nacionalni problem (87% ispitanika). 55% liječnika je smatralo da je rezistencija problem na njihovom radnom mjestu (Wester i sur., 2002).

Srinivasan i suradnici su 2004. godine proveli istraživanje o stavovima, mišljenjima i znanjima liječnika u Johns Hopkins bolnici u Baltimoru o upotrebi antimikrobnih lijekova i rezistenciji. Međuostalim, u njihovom istraživanju liječnici su pokazali veliku zabrinutost o

problemu rezistencije. Čak 93% liječnika je smatralo da je rezistencija veliki problem na njihovom radnom mjestu, a 72% liječnika je smatralo da se antimikrobni lijekovi pretjerano koriste u njihovoj bolnici (Srinivasan i sur., 2004).

Pulcini i suradnici su 2010. godine proveli slično istraživanje među liječnicima obiteljske medicine u Alpes-Maritimes području u Francuskoj. 91% liječnika je percipiralo bakterijsku rezistenciju kao nacionalni problem, a 65% je smatralo da je rezistencija problem na njihovom radnom mjestu (Pulcini i sur., 2010).

U Španjolskoj, 2010. godine, provedeno je istraživanje s liječnicima pet različitih bolnica. 94,3 % liječnika je smatralo da je bakterijska rezistencija nacionalni problem, a 91,3 % liječnika je smatralo da je rezistencija problem u njihovoj ustanovi (Navarro-San Francisco i sur., 2010).

2015. godine su u Saudijskoj Arabiji provedena dva istraživanja, u Riyadhu i Jeddahu. Al-Harthi i suradnici su u Jeddahu dobili rezultate prema kojima 77,8% liječnika obiteljske medicine smatra da je rezistencija svjetski problem i problem u Saudijskoj Arabiji, a 70,4% smatra da je rezistencija problem na njihovom radnom mjestu. 89,9 % liječnika specijalista je smatralo da je rezistencija svjetski problem, 94,2 da je rezistencija problem u Saudijskoj Arabiji, a 87% da je rezistencija problem na njihovom radnom mjestu (Al-Harthi i sur.,2015). Baadani i suradnici su u Riyadhu dobili rezultate da 75,6 % liječnika smatra da je rezistencija problem u bolnici u kojoj rade, 69,8 % je smatralo da je rezistencija problem u zemlji i 76,4% da je svjetski problem (Baadani i sur.,2015). Godinu kasnije, Alothman i suradnici su također proveli ispitivanje u Rijadhu, u dvije bolnice. Ovaj put, 82 % liječnika je smatralo da je bakterijska rezistencija svjetski problem, a 78% da je nacionalni problem (Alothman i sur., 2016).

2018. godine je provedeno slično istraživanje u Korle-Bu bolnici u Ghani. 30,1% liječnika je smatralo rezistenciju svjetskim problemom, 18,5 % nacionalnim problemom i 8,9% je smatralo da je rezistencije problem u bolnici (Labi i sur., 2018).

Uspoređujući rezultate navedenih istraživanja s našim istraživanjem, moguće je primijetiti da su liječnici u Hrvatskoj u većem postotku prepoznali rezistenciju na antibiotike svjetskim problemom. Istraživanja u Španjolskoj i Francuskoj su pokazala da više liječnika smatra rezistenciju nacionalnim problemom, iako razlika nije velika. Također, liječnici u Hrvatskoj u

manjem postotku smatraju da je rezistencija problem na njihovom radnom mjestu u odnosu na navedena istraživanja. Najmanji rezultati su dobiveni u Ghani gdje je samo 18,5% liječnika smatralo da je rezistencija nacionalni problem, a 8,9% da je rezistencija problem na njihovom radnom mjestu..

5.2. Alternative antibioticima

U našem istraživanju najveći broj ispitanika je upoznat s probioticima (n=122; 75,3%), cjepivima (n=100; 61,7%) i protutijelima (n=64; 39,5%) kao alternativama antibioticima, dok je s bakteriofagima poznato 25,9% (n=42) ispitanika.

Prema mišljenju ispitanika najviše obećavaju cjepiva (48,8%), protutijela (35,2%), probiotici (33,9%) i bakteriofagi (32,7%). Ovi rezultati se slažu s podacima iz preglednog članka Czaplewskog i suradnika. Naime, protutijela, probiotici i cjepiva su, prema podacima iz kliničkih istraživanja faze dva i tri, najnaprednije alternative antibioticima (Czaplewski i sur., 2016).

Pregledom literature sam ustanovila da dosad nije napravljeno istraživanje mišljenja liječnika o alternativama antibiotika, osim o probioticima.

Williams i suradnici su proveli istraživanje mišljenja liječnika (gastroenterologa i liječnika obiteljske medicine) o terapiji probioticima u području gastroenterologije. Svi ispitanici su smatrali probiotike sigurnom i 98% ispitanika je smatralo da probiotici imaju ulogu u liječenju gastrointestinalnih bolesti ili simptoma, uključujući dijareju uzrokovanu *Clostridium difficile* i antibioticima. Međutim, 82% liječnika je smatralo da su probiotici samo ponekad učinkoviti, a 7% da su uvijek učinkoviti. 74% liječnika je imalo pacijente koji su uzimali probiotike zbog dijareje uzrokovane *Clostridium difficile* (Williams i sur, 2010). U sličnom istraživanju, najčešća indikacija za probiotike, pogotovo *Lactobacillus* GG, je bila prevencija (79% liječnika) i liječenje (66% liječnika) dijareje uzrokovane antibioticima (Draper i sur., 2017). Također, mnogi liječnici preporučuju primjenu probiotika kod rekurentnih vulvogaginalnih kandidijaza (Watson i sur., 2012).

5.3. Terapija bakteriofagima

Prema dostupnim podacima, ne postoji sveobuhvatno istraživanje stavova i mišljenja liječnika o terapiji bakteriofagima. Međutim, postoje dva istraživanja ove tematike i oba pokazuju negativan stav prema terapiji bakteriofagima, ali i zabrinutost zbog rezistencije bakterija.

Rahman je 2014. godine proveo statističku analizu potrebe i mogućnosti uvođenja terapije bakteriofagima u gradu Karachi. Ispitanike je podijelio u tri skupine; pacijenti, liječnici i istraživači. Istraživanjem je pokazao da postoji potreba za alternativom antibioticima, ali i da javnost ima negativan stav prema virusima. Istraživači su smatrali da je potrebno još dosta istraživanja prije primjene bakteriofaga u terapijske svrhe (Rahman, 2014).

Alcantara je 2012. godine u Japanu provela istraživanje mišljenja liječnika, istraživača i zaposlenika farmaceutskih tvrtki na izvršnim pozicijama o rezistenciji na antibiotike i terapiji bakteriofagima. Liječnici su bili specijalisti interne medicine od kojih je 85% izrazilo osobnu zabrinutost za rezistenciju. Većina ispitanika nije bila sigurna da je terapija bakteriofagima učinkovita. Nijedan liječnik u upitniku nije smatrao bakteriofage učinkovitim u liječenju bakterijskih infekcija, u usporedbi s 30% zaposlenika farmaceutskih tvrtki. Više ispitanika je smatralo da terapija bakteriofagima nije sigurna, nego da je sigurna. Većina istraživača i djelatnika farmaceutskih tvrtki nije bila sigurna je li terapija bakteriofagima profitabilna, a ostatak ju je smatrao neprofitabilnom. Sveukupno, ovo je istraživanje pokazalo poprilično negativno mišljenje ispitanika prema bakteriofagima (Alcantara, 2012).

U istraživanju koje smo proveli nije izražen negativan stav liječnika prema bakteriofagima (21%), ali niti pozitivan (6,2%).

Polovica ispitanika nije sigurna je li terapija bakteriofagima sigurnija i učinkovitija od antibiotika i da li bi bila prijetnja za javno zdravstvo. Četvrtina ispitanika smatra da bi terapija bakteriofagima trebala biti dostupna u praksi i moguća za propisivanje od strane liječnika, ali je i dalje veći broj liječnika neodlučno (39 liječnika naspram 65). Samo 5,5% liječnika smatra da bi terapija bakteriofagima trebala biti dostupna isključivo kao alternativna terapija na teret pacijenta, četvrtina ispitanika se ne slaže, ali je i dalje najveći broj neodlučenih liječnika.

37,6% liječnika smatra da bi pacijenti trebali imati mogućnost izbora u odabiru terapije bakteriofagima. U ovim pitanjima, kontinuirano postoji 40-50% ispitanika koji su odabirali „niti da niti ne“ odgovor što bi moglo indicirati nepoznavanje navedene terapije. To potvrđuje i veliki broj ispitanika koji želi više informacija o bakteriofagima (81,5%) te koji smatraju da bi spoznaje o bakteriofagima trebale biti zastupljenije u obrazovanju (74%), a također je 77,1% liječnika i samo odgovorilo da ne zna dovoljno o navedenoj terapiji.

Veliki broj liječnika (71%) smatra da bi trebali bar moći informirati pacijente o terapiji, ali i da se ne bi trebala razmatrati sve dok ne postoji dovoljno dokaza na najvišoj razini (56,2%).

Uzevši sve to u obzir, samo 2,5% (n=4) liječnika ne bi preporučilo terapiju bakteriofagima, dok petina (n=31) bi preporučila. Većina sudionika istraživanja nije imala jasno izražen stav na tu temu i odabrali su opciju „nisam siguran“.

Liječnici su mogli zaokružiti tri prednosti i nedostatka terapije koje su smatrali najbitnijim. Ispitanici su prepoznali manji potencijal indukcije rezistencije, specifičnost i minimalan štetan učinak na prirodnu mikrobiotu kao glavne prednosti bakteriofaga, a nedovoljno dokaza, potencijalnu interakciju s imunološkim sustavom i nepovjerenje javnosti kao glavne nedostatke terapije bakteriofagima.

6. ZAKLJUČAK

U okviru ovog diplomskog rada istražena su mišljenja i stavovi liječnika o rezistenciji bakterija na antibiotike i alternativama antibioticima s naglaskom na bakteriofage.

Temeljem proučene literature i dobivenih rezultata možemo zaključiti:

Rezistencija bakterija na antibiotike je prijetnja za globalno zdravlje.

Većina liječnika u Hrvatskoj smatra rezistenciju bakterija na antibiotike vrlo ozbiljnim problemom.

Rezistencija bakterija na antibiotike je potaknula sve veći interes i razmatranje ne-antibiotskih mogućnosti u prevenciji i liječenju bakterijskih infekcija.

U alternative antibioticima koje obećavaju spadaju protutijela, probiotici, bakteriofagi, lizini bakteriofaga, antimikrobni peptidi, imunostimulirajući produkti i cjepiva.

Najviše liječnika u Hrvatskoj je upoznato s probioticima, cjepivima i protutijelima.

Liječnici u Hrvatskoj nisu dovoljno upoznati s terapijom bakteriofagima, ali su izrazili želju da saznaju više.

Liječnici u Hrvatskoj nemaju izražen negativan stav prema bakteriofagima, ali niti pozitivan.

Liječnici u Hrvatskoj smatraju da su manji potencijal indukcije rezistencije, specifičnost i minimalan štetan učinak na mikrobiotu glavne prednosti bakteriofaga.

Liječnici u Hrvatskoj smatraju da su nedovoljno dokaza, potencijalna interakcija s imunološkim sustavom i nepovjerenje javnosti glavni nedostaci terapije bakteriofagima.

7. LITERATURA

About Phage Therapy, 2013., <http://www.phagoburn.eu>, pristupljeno 4.5.2018.

About Phagoburn, 2013., <http://www.phagoburn.eu>, pristupljeno 4.5.2018.

Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG i Kutter EM. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*, 2011, 1, 66–85.

Al-Harthi SE, Khan LM, Osman AM, Alim MA, Saadah OI, Almohammadi AA, Khan FM, Kamel FO. Perceptions and knowledge regarding antimicrobial stewardship among clinicians in Jeddah, Saudi Arabia. *Saudi Med J*, 2015, 36, 813-20.

Alcantara LL. An analysis of the antibiotic industry: An innovator's dilemma? *Journal of International Business Research*, 2012, 11, 1-11.

Alothman A, Algwizani A, Alsulaiman M, Alalwan A, Binsalih S, Bosaeed M. Knowledge and Attitude of Physicians Toward Prescribing Antibiotics and the Risk of Resistance in Two Reference Hospitals. *Infect Dis (Auckl)*, 2016, 9, 33-8.

Awad HM, El-Shahed KYI, Aziz R, Sarmidi MR, El-Enshasy HA. Antibiotics as microbial secondary metabolites: Production and application. *Jurnal Teknologi (Sciences and Engineering)*, 2012, 59, 101–111.

Baadani AM, Baig K, Alfahad WA, Aldalbahi S, Omrani AS. Physicians' knowledge, perceptions, and attitudes toward antimicrobial prescribing in Riyadh, Saudi Arabia. *Saudi Med J*, 2015, 36, 613-619.

Bacteriophages as vectors, 2018., <https://biocyclopedia.com>, pristupljeno 28.5.2018.

Bakhshinejad B, Karimi M, Sadeghizadeh M. Bacteriophages and medical oncology: targeted gene therapy of cancer. *Med Oncol*, 2014, 31, 110.

Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*, 1986, 1, 307-10.

Bondy-Denomy J, Garcia B, Strum S, Du M, Rollins MF, Hidalgo-Reyes Y, Wiedenheft B, Maxwell KL, Davidson AR. Multiple mechanism for CRISPR-Cas inhibition by anti-CRISPR-Cas proteins. *Nature*, 2015, 526, 136-139.

Bowling A. Quantitative research: sampling and research methods. Buckingham, Open University Press, 2002, str. 163-255.

Czaplewski L i sur. Alternatives to antibiotics-a pipeline portfolio review. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16, 239–251.

Draper K, Ley C, Parsonnet J. Probiotic guidelines and physician practice: a cross-sectional survey and overview of the literature. *Benef Microbes*, 2017, 8, 507-519.

Duggan JM, You D, Cleaver JO, Larson DT, Garza RJ, Guzman Pruneda FA, Tuvim MJ, Zhang J, Dickey BF, Evans SE. Synergistic interactions of TLR2/6 and TLR9 induce a high level of resistance to lung infection in mice. *J Immunol*, 2011, 186, 5916–5926.

Francetić I. Lijekovi koji djeluju na infektivne i parazitarne bolesti. *Paediatr Croat*, 2001, 45, 1-11.

Francetić I i sur. Farmakoterapijski priručnik. 7.izdanje, Zagreb, Medicinska naklada, 2015, str. 382.

Goldenberg JZ, Ma SS, Saxton JD i sur. Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile* associated diarrhea in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev*, 2013, 5.

Hanlon GW. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *Int J Antimicrob Agents*, 2007, 30, 118-128.

Hancock REW, Nijnik A, Philpott DJ. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nat Rev Microbiol*, 2012, 10, 243–254.

Jain P, Hartman TE, Eisenberg N, O'Donnell MR, Kriakov J, Govender K, Makume M, Thaler DS, Hatfull GF, Sturm AW, Larsen MH, Moodley P, Jacobs WR Jr. $\phi(2)$ GFP10, a high-intensity fluorophage, enables detection and rapid drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum samples. *J Clin Microbiol*, 2012, 50, 1362-1369.

Kalenić S i sur. Medicinska mikrobiologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 99.

Keen EC. Phage Therapy: Concept to Cure. *Front Microbiol*, 2012, 3, 238.

Labi AK, Obeng-Nkrumah N, Bjerrum S, Aryee NAA, Ofori-Adjei YA, Yawson AE, Newman MJ. Physicians' knowledge, attitudes, and perceptions concerning antibiotic resistance: a survey in a Ghanaian tertiary care hospital. *BMC Health Serv Res*, 2018, 18, 126.

Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8, 317-327.

Lin DM, Koskella B, Lin HC. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*, 2017, 8, 162-173.

Ling-Juan Z, Richard LG. Antimicrobial peptides. *Curr Biol*, 2016, 26, 14-19.

Loc-Carrillo C. i Abedon S. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 2011, 1, 111–114.

Malik DJ, Sokolov IJ, Vinner GK, Mancuso F, Cinquerrui S, Vladislavljevic GT, Clokie MRJ, Garton NJ, Stapley AGF, Kirpichnikova A. Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Adv Colloid Interface Sci*, 2017, 249, 100-133.

Nacionalni program za kontrolu otpornosti bakterija na antibiotike 2017. – 2021., 2017., <http://www.zdravlje.gov.hr>, pristupljeno 27.5.2018.

Navarro-San Francisco C, Del Toro MD, Cobo J, De Gea-García JH, Vañó-Galván S, Moreno-Ramos F, Rodríguez-Baño J, Paño-Pardo JR. Knowledge and perceptions of junior and senior Spanish resident doctors about antibiotic use and resistance: results of a multicenter survey. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2013, 31, 199-204.

Pande J, Szewczyk MM, Grover AK. Phage display: concept, innovations, applications and future. *Biotechnol Adv*, 2010, 28, 849-858.

Pastagia M, Schuch R, Fischetti VA, Huang DB. Lysins: the arrival of pathogen-directed anti-infectives. *J Med Microbiol*, 2013, 62, 1506–1516.

Potera C. Phage renaissance: new hope against antibiotic resistance. *Environ Health Perspect*, 2013, 121, 48-53.

Pulcini C, Naqvi A, Gardella F, Dellamonica P, Sotto A. Bacterial resistance and antibiotic prescriptions: perceptions, attitudes and knowledge of a sample of French GPs. *Med Mal Infect*, 2010, 40, 703-9.

Rahman A. A statistical analysis of need and possibility of administration of bacteriophage therapy. *12th International Conference on Statistical Sciences*, 2014, 26, 209-218.

Reyes A, Semenkovich NP, Whiteson K, Rohwer F, Gordon JI. Going viral: next-generation sequencing applied to phage populations in the human gut. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10, 607–617.

Rhoads DD, Wolcott RD, Kuskowski MA, Wolcott BM, Ward LS, Sulakvelidze A. Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. *J Wound Care*, 2009, 237, 240-243.

Roach DR i Donovan DM. Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications. *Bacteriophage*, 2015, 5, e1062590.

Salmond GPC i Fineran PC. A century of the phage: Past, present and future. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 777–786.

Samson JE, Magadan AH, Sabri M, Moineau S. Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11, 675-687.

Scarpellini E, Ianaro G, Attili F, Bassanelli C, De Santis A, Gasbarrini A. The human gut microbiota and virome: Potential therapeutic implications. *Digestive and Liver Disease*, 2015, 47, 1007–1012.

Schmelcher M, Loessner MJ. Application of bacteriophages for detection of foodborne pathogens. *Bacteriophage*, 2014, 4, e28137.

Schuch R, Lee HM, Schneider BC, Sauve KL, Law C, Khan BK, Rotolo JA, Horiuchi Y, Couto DE, Raz A, Fischetti VA, Huang DB, Nowinski RC, Wittekind M. Combination therapy with lysin CF-301 and antibiotic is superior to antibiotic alone for treating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced murine bacteremia. *J Infect Dis* 2014, 209, 1469–1478.

Srinivasan A, Song X, Richards A, Sinkowitz-Cochran R, Cardo D, Rand C. A survey of knowledge, attitudes, and beliefs of house staff physicians from various specialties concerning antimicrobial use and resistance. *Arch Intern Med*, 2004, 164, 1451-1456.

Steinmann J, Halldórsson S, Agerberth B, Gudmundsson GH. Phenylbutyrate induces antimicrobial peptide expression. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53, 5127-5133.

Tambić-Andrašević A. Kontrola rezistencije bakterija na antibiotike u Hrvatskoj. *Croatian Journal of Infection*, 2009, 29, 145–150.

Theodorakopoulou M, Perros E, Giamarellos-Bourboulis EJ, Dimopoulos G. Controversies in the management of the critically ill: the role of probiotics. *Int J Antimicrob Agents*. 2013, 42, 41-44.

Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J, Tavera-Mendoza L, Lin R, Hanrahan JW, Mader S, White JH. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol*, 2004, 173, 2909-2912.

Watson CJ, Pirotta M, Myers SP. Use of complementary and alternative medicine in recurrent vulvovaginal candidiasis--results of a practitioner survey. *Complement Ther Med*, 2012, 20, 218-21.

Weinbauer MG. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev*, 2004, 28, 127-181.

Wester CW, Durairaj L, Evans AT, Schwartz DN, Husain S, Martinez E. Antibiotic resistance: A survey of physician perceptions. *Arch Intern Med*, 2002, 162, 2210–2216.

Williams MD, Ha CY, Ciorba MA. Probiotics as Therapy in Gastroenterology: A Study of Physician Opinions and Recommendations. *J Clin Gastroenterol*, 2010, 44, 631–636.

Wittebole X, De Roock S, Opal SM. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*, 2014, 5, 226-235.

Yosef I, Manor M, Kiro R, Qimron U. Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112, 7267-7272.

8.1. SAŽETAK/SUMMARY

SAŽETAK

Rezistencija bakterija na antibiotike je ozbiljan globalni problem koji je potaknuo razmatranje „ne-antibiotskih“ mogućnosti liječenja i prevencije bakterijskih infekcija tzv. alternative antibioticima. Najpoznatije alternative antibioticima koje se trenutno istražuju su protutijela, probiotici, bakteriofagi, lizini bakteriofaga, antimikrobni peptidi, imunostimulirajući produkti i cjepiva.

Bakteriofagi su virusi koji mogu inficirati i lizirati specifičnu bakteriju. Otkriveni su 1915. godine, ali otkrićem antibiotika i zaboravljeni u većem dijelu svijeta. Razvojem rezistencije, vratio se interes za bakteriofage i njihovu ulogu u liječenju rezistentnih bakterijskih infekcija.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati stavove i mišljenja liječnika o rezistenciji na antibiotike i alternativama antibioticima, posebice o bakteriofagima. Za potrebe ovog istraživanja korišten je kvantitativni pristup prikupljanja podataka pomoću u validiranog upitnika, a ispitanici su bili liječnici Republike Hrvatske, većinom liječnici obiteljske medicine i specijalisti kliničke mikrobiologije.

Većina liječnika u Hrvatskoj smatra rezistenciju bakterija na antibiotike vrlo ozbiljnim problemom. Najviše liječnika u Hrvatskoj je upoznato s probioticima, cjepivima i protutijelima kao alternativama antibioticima. Liječnici u Hrvatskoj nisu dovoljno upoznati s terapijom bakteriofagima, ali su izrazili interes za dodatnim informacijama. Liječnici u Hrvatskoj nemaju izražen negativan stav prema bakteriofagima, ali niti pozitivan.

SUMMARY

Antibiotic resistance is a serious global problem that has encouraged consideration of "non-antibiotic" possibilities for treatment and prevention of bacterial infections, so called alternatives to antibiotics. The most known alternatives to antibiotics, currently being investigated, are antibodies, probiotics, bacteriophages, lysins, antimicrobial peptides, immune stimulation and vaccines.

Bacteriophages are viruses that can infect and lyse a specific bacterium. They were discovered in 1915 but soon forgotten, in most of the world, after the antibiotic discovery. Now, because of antibiotic resistance, the interest for bacteriophages and their role in the treatment of resistant bacterial infections has returned.

The aim of this study was to examine the physicians' attitudes and opinions regarding antibiotic resistance and alternatives to antibiotics, especially bacteriophages. For the purposes of this study, the quantitative questionnaire was designed and validated, and physicians from Croatia, mostly general medicine practitioners and clinical microbiology specialists were included in the study.

Most physicians in Croatia consider antibiotic resistance a very serious problem. Most physicians in Croatia are familiar with probiotics, vaccines and antibodies as antibiotic alternatives. Physicians in Croatia are not sufficiently familiar with bacteriophage therapy but would like to know more about it. Physicians in Croatia do not show a negative, but neither positive, attitude towards bacteriophages.

9.PRILOZI

9.1. Upitnik:

Odjeljak 1: Opći podaci

1. Spol:
 - a. Muško
 - b. Žensko
2. Dob: _____
3. Mjesto rođenja: _____
4. Mjesto studiranja/ Fakultet: _____
5. Bračno stanje:
 - a. Neoženjen/neudana
 - b. Oženjen/udana
 - c. Vanbračna zajednica
 - d. Rastavljen/a
 - e. Udovac/udovica
6. Stručni stupanj:
 - a. liječnik bez specijalizacije
 - b. liječnik na specijalizaciji
 - c. liječnik specijalist
7. Specijalizacija:_____
8. Znanstveni stupanj/Znanstveno-nastavno zvanje:
 - a. mr.sc
 - b. dr.sc
 - c. doc.dr.sc./znanstv. Suradnik
 - d. izvanredni prof.dr.sc./viši znanstv.suradnik
 - e. prof.dr.sc./znanstveni savjetnik
 - f. nemam ga
9. Radno mjesto
 - a. Bolnica
 - b. Klinika
 - c. Ordinacija
 - d. Fakultet
 - e. Znanstvena ustanova

f. Drugo: _____

10. Dužina ukupnog radnog staža: _____

Odjeljak 2: Bakterijska rezistencija

Izjava	Uopće se ne slažem	Ne slažem se	Niti se slažem niti ne slažem	Slažem se	Slažem se u potpunosti
1. Smatram da je bakterijska rezistencija svjetski problem.					
2. Smatram da je bakterijska rezistencija problem u Hrvatskoj.					
3. Smatram da je bakterijska rezistencija problem na mom radnom mjestu.					
4. Smatram da će bakterijska rezistencija biti veći problem u budućnosti.					
5. Zabrinjava me budućnost liječenja bakterijskih infekcija.					

Odjeljak 3: Alternative antibioticima

1. Zaokružite s kojim ste alternativnim terapijama bakterijskih infekcija upoznati:

- a. Protutijela
- b. Probiotici
- c. Bakteriofagi
- d. Lizini bakteriofaga
- e. Antimikrobni peptidi
- f. Imunostimulirajući produkti
- g. Cjepiva
- h. Niti jednom
- i. Drugo: _____

2. Ukoliko ste upoznati, koje alternativne terapije bakterijskih infekcija smatrate obećavajućima i koliko? Ukoliko niste upoznati, prijedite na sljedeće pitanje.

Alternativa antibioticima	Uopće ih ne smatram obećavajućima	Ne smatram ih obećavajućima	Niti da niti ne	U potpunosti ih smatram obećavajućima
Protutijela				
Probiotici				
Bakteriofagi				
Lizini bakteriofaga				
Antimikrobni peptidi				
Imunostimulirajući produkti				
Cjepiva				
Drugo (ispunjeno u prethodnom pitanju)				

Odjeljak 4: Terapija bakteriofagima

1. Slijedi niz izjava za koje možete odabrati tvrdnje od „uopće se ne slažem“ do „u potpunosti se slažem.“ Ukoliko smatrate da ne možete odgovoriti na neku od navedenih izjava, prijedite na sljedeću izjavu ili pitanje.

Izjava	Uopće se ne slažem	Ne slažem se	Niti se slažem niti ne slažem	Slažem se	U potpunosti se slažem
1. Terapija bakteriofagima je sigurnija od antibiotske terapije.					
2. Terapija bakteriofagima je jednako učinkovita kao antibiotska terapija.					
3. Terapija bakteriofagima može biti prijetnja za javno zdravstvo.					
4. Učinkovitost terapije bakteriofagima je isključivo posljedica placebo učinka.					
5. Terapija bakteriofagima bi trebala biti dostupna u praksi i moguća za propisivanje od strane liječnika.					

6. Smatram da bi terapija bakteriofagima trebala biti dostupna isključivo kao alternativna terapija na teret pacijenta.					
7. Htio/Htjela bih dobiti više informacija o terapiji bakteriofagima.					
8. Terapija bakteriofagima se ne bi trebala razmatrati sve dok nema dovoljno dokaza na najvišoj razini (randomizirane kliničke studije).					
9. Pacijenti bi trebali imati mogućnost izbora u odabiru terapije bakteriofagima.					
10. Zdravstveni djelatnici bi trebali moći informirati pacijenta o terapiji bakteriofagima.					
11. Znanstvene spoznaje o terapiji bakteriofagima bi trebale biti više					

zastupljene u obrazovanju (diplomskom studiju/stručnom usavršavanju).					
12. Smatram da ne znam dovoljno o terapiji bakteriofagima.					

2. Ukoliko biste mogli, da li bi preporučili terapiju bakteriofagima svojim pacijentima?

- a. Da
- b. Ne
- c. Nisam siguran/sigurna

3. Što smatrate glavnim prednostima terapije bakteriofagima? (Moguće je zaokružiti do 3 odgovora)

- a. Specifičnost
- b. Samoograničenje
- c. Brži i jeftiniji razvoj od razvoja novih antibiotika
- d. Manji potencijal indukcije rezistencije (od antibiotika)
- e. Minimalan štetan učinak na mikrobiotu
- f. Minimalan štetan učinak na okoliš
- g. Niti jedno
- h. Nisam upoznat/upoznata s terapijom bakteriofagima
- i. Drugo: _____

4. Što smatrate glavnim nedostacima terapije bakteriofagima? (Moguće je zaokružiti do 3 odgovora)

- a. Selekcija faga
- b. Specifičnost
- c. Potencijalna interakcija s imunološkim sustavom
- d. Stabilnost
- e. Nepovjerenje javnosti
- f. Nedovoljno dokaza

- g. Niti jedno
- h. Nisam upoznat/upoznata s terapijom bakteriofagima
- i. Drugo:_____

5. Koji ste način informiranja koristili u vezi terapije bakteriofagima? (Moguće je označiti više odgovora.)

- d. Internet
- e. Stručni skup
- f. Suradnici s posla
- g. Stručna literatura
- h. Nisam upoznat/upoznata s terapijom bakteriofagima
- i. Drugo:_____

Ukoliko imate dodatnih komentara na temu, molimo Vas da ih ovdje napišete. Hvala Vam na sudjelovanju._____

Prilog 2:



FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ante Kovačića 1

10000 Zagreb

MOLBA

Predmet: Molba za suradnju u provedbi istraživanja u svrhu izrade diplomskog rada

Poštovani,

zovem se Dajana Šulavjak i studentica sam pete godine farmacije na Farmaceutsko-biochemijskom fakultetu u Zagrebu.

U svrhu izrade diplomskog rada pod mentorstvom doc.dr.sc. Maja Ortner Hadžić i izv.prof.dr.sc. Maja Šegvić Klarić provodimo istraživanje koje ispituje mišljenje i stav liječnika o terapiji bakterijskih infekcija bakteriofagima. Istraživanje se provodi na području Republike Hrvatske od studenog 2017. godine do travnja 2018. Istraživanje je dizajnirano kao presječno istraživanje validiranim upitnikom.

Ovim putem bih Vas molila da odvojite dio Vašeg vremena kako biste odgovorili na pitanja postavljena u upitniku. **Ispunjavanje upitnika traje 5 minuta i potpuno je anonimno.**

Pristup prikupljenim podacima imat će samo provodioci istraživanja te će se podaci koristiti isključivo za potrebe ovog istraživanja i izradu diplomskog rada.

Upitnik možete pronaći na sljedećem linku: <https://goo.gl/forms/pLOI26Zc0t5JmXdR2>

Imate li bilo kakvih pitanja, slobodno nas kontaktirajte: studentica Dajana Šulavjak (dsulavja@student.pharma.hr), doc.dr.sc. Maja Ortner Hadžić (mortner@pharma.hr)

Zahvaljujem na suradnji.

Srdačan pozdrav,

Dajana Šulavjak

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Centar za primijenjenu farmaciju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

STAVOVI I MIŠLJENJA LIJEČNIKA O TERAPIJI BAKTERIJSKIH INFEKCIJA BAKTERIOFAGIMA

Dajana Šulavjak

SAŽETAK

Rezistencija bakterija na antibiotike je ozbiljan globalni problem koji je potaknuo razmatranje „ne-antibiotskih“ mogućnosti liječenja i prevencije bakterijskih infekcija tzv. alternative antibioticima. Najpoznatije alternative antibioticima koje se trenutno istražuju su protutijela, probiotici, bakteriofagi, lizini bakteriofaga, antimikrobni peptidi, imunostimulirajući produkti i cjepiva. Bakteriofagi su virusi koji mogu inficirati i lizirati specifičnu bakteriju. Otkriveni su 1915. godine, ali otkrićem antibiotika i zaboravljeni u većem dijelu svijeta. Razvojem rezistencije, vratio se interes za bakteriofage i njihovu ulogu u liječenju rezistentnih bakterijskih infekcija. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati stavove i mišljenja liječnika o rezistenciji na antibiotike i alternativama antibioticima, posebice o bakteriofagima. Za potrebe ovog istraživanja korišten je kvantitativni pristup prikupljanja podataka pomoću validiranog upitnika, a ispitanici su bili liječnici Republike Hrvatske, većinom liječnici obiteljske medicine i specijalisti kliničke mikrobiologije. Većina liječnika u Hrvatskoj smatra rezistenciju bakterija na antibiotike vrlo ozbiljnim problemom. Najviše liječnika u Hrvatskoj je upoznato s probioticima, cjepivima i protutijelima kao alternativama antibioticima. Liječnici u Hrvatskoj nisu dovoljno upoznati s terapijom bakteriofagima, ali su izrazili interes za dodatnim informacijama. Liječnici u Hrvatskoj nemaju izražen negativan stav prema bakteriofagima, ali niti pozitivan.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 53 stranica, 12 grafičkih prikaza, 10 tablica i 56 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: bakterijska rezistencija, alternative antibioticima, bakteriofag

Mentor: **Dr. sc. Maja Ortner Hadžiabdić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Maja Šegvić Klarić, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Maja Ortner Hadžiabdić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Maja Šegvić Klarić, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Lidija Bach Rojckey, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Centre for Applied Pharmacy
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

PHYSICIANS' ATTITUDES AND OPINIONS ABOUT BACTERIOPHAGE THERAPY

Dajana Šulavjak

SUMMARY

Antibiotic resistance is a serious global problem that has encouraged consideration of "non-antibiotic" possibilities for treatment and prevention of bacterial infections, so called alternatives to antibiotics. The most known alternatives to antibiotics, currently being investigated, are antibodies, probiotics, bacteriophages, lysins, antimicrobial peptides, immune stimulation and vaccines. Bacteriophages are viruses that can infect and lyse a specific bacterium. They were discovered in 1915 but soon forgotten, in most of the world, after the antibiotic discovery. Now, because of antibiotic resistance, the interest for bacteriophages and their role in the treatment of resistant bacterial infections has returned. The aim of this study was to examine the physicians' attitudes and opinions regarding antibiotic resistance and alternatives to antibiotics, especially bacteriophages. For the purposes of this study, the quantitative questionnaire was designed and validated, and physicians from Croatia, mostly general medicine practitioners and clinical microbiology specialists were included in the study. Most physicians in Croatia consider antibiotic resistance a very serious problem. Most physicians in Croatia are familiar with probiotics, vaccines and antibodies as antibiotic alternatives. Physicians in Croatia are not sufficiently familiar with bacteriophage therapy but would like to know more about it. Physicians in Croatia do not show a negative, but neither positive, attitude towards bacteriophages.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 53 pages, 12 figures, 10 tables and 56 references. Original is in Croatian language.

Keywords: antibiotic resistance, alternatives to antibiotics, bacteriophages

Mentor: **Maja Ortner Hadžiabdić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Maja Šegvić Klarić, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Maja Ortner Hadžiabdić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Maja Šegvić Klarić, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Lidija Bach Rojecky, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2018.